

STIM1-regulierter Ca^{2+} -Einstrom durch die apikale und die basolaterale Membran im Kolonepithel

INAGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

Ph.D.

der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Kaoru Onodera

Tierärztin aus Japan

AUS DEM INSTITUT FÜR VETERINÄR-PHYSIOLOGIE UND –BIOCHEMIE
DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN

Supervisor: Prof. Dr. Martin Diener

Cosupervisor:

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Prüfer:

Datum der Disputation:

1. Inhaltverzeichnis

Inhalt	Seite
1. Inhaltverzeichnis	1
2. Abkürzungsverzeichnis	6
3. Einleitung	11
3.1. Das Kolon – Morphologie und Funktion der Epithelzellen	11
3.2. Calcium als intrazellulärer Botenstoff	18
3.3. Intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher	25
3.4. Speichergesteuerter Ca^{2+} -Einstrom (SOCE)	31
3.5. STIM und Orai – intrazellulärer Ca^{2+} -Sensor und speichergesteuerte Kanäle	35
4. Fragestellung	47
5. Material	48
5.1. Versuchstiere	48
5.2. Kolontumorepithelzelllinie	48
5.3. Geräte	48
5.4. Lösungen	49
5.4.1. Gelatine-Lösungen	49
5.4.2. Phosphatpuffer	49
5.4.3. Phosphate-buffered saline (PBS)	50
5.4.4. PBS-T (PBS mit Triton X-100)	50
5.4.5. Paraformaldehyd-Lösung (PFA, 4 %)	51
5.4.6. Blocking-Lösung	51
5.4.7. Parsons-Lösung	52
5.4.8. Tyrode-Lösung	52
5.4.9. Zellkulturmedien	53
- Ready mix RPMI mit Penicillin-Streptomycin	53
- Hank's BSS	53
- Hank's BSS ohne Calcium/Magnesium	54

1. Inhaltverzeichnis

- Trypsin/EDTA	54
5.4.10. Medien für die Transfektionsexperimente	55
-5X siRNA Buffer	55
-Opti-MEM	55
- Lipofectamin-Lösung	55
5.5. Antikörper	56
5.5.1. Primärantikörper	56
5.5.2. Sekundärantikörper	57
5.6. Farbstoffe	57
5.6.1. Cy3-Lösung	57
5.6.2. Alexa Fluor®488	58
5.6.3. Phalloidin-FITC	59
5.6.4. Kresylviolett-Färbelösung	60
5.6.5. DAPI-Lösung	60
5.6.6. Fura-2AM-Lösung	61
5.7. Chemikalien	61
5.7.1. 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB)	62
5.7.2. Colchicin	62
5.7.3. Brefeldin A	63
5.7.4. Carbachol	63
5.7.5. Cyclopiazonsäure (CPA)	64
5.7.6. Forskolin	64
5.7.7. Jasplakinolide	65
5.7.8. LaCl ₃	65
5.7.9. Rutheniumrot	65
5.7.10. Thapsigargin	66
5.8. siRNA	67
6. Methoden	68
6.1. Präparation des Gewebes	68
6.1.1. Herstellung eines Mukosa-Submukosa-Präparats	68

1. Inhaltverzeichnis

6.1.2. Inkubation des Gewebes	69
6.2. Immunohistochemische Analyse des Darmpräparates	69
6.2.1. Theorie der Immunofluoreszenz	69
6.2.2. Die verwendeten Antikörper	70
6.2.3. Negativkontrollen	71
6.2.4. Paraformaldehydfixierung	71
6.2.5. Kryofixierung	72
6.2.6. Herstellung der Gewebeschnitte	73
6.2.7. Einfachmarkierung	73
6.2.8. Doppelmarkierung	76
6.2.9. Mikroskopie	80
6.2.10. Konfokalmikroskopie	80
6.3. Ussingkammer-Versuche	82
6.3.1. Theorie der Ussingkammer-Technik	82
6.3.2. Die Messkammer	85
6.3.3. Versuchsdurchführung und Datenerfassung	86
6.4. Zellkultur	87
6.4.1. Auftauen der Zellen	87
6.4.2. Mediumwechsel	87
6.4.3. Passagieren	87
6.5. Calcium-Imaging mit Fura-2 AM	88
6.5.1. Theorie des Calcium-Imagings	88
6.5.2. Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM	90
6.5.3. Der Calcium-Imaging-Messstand	92
6.5.4. Die Imaging-Messkammer mit Perfusionssystem	93
6.5.5. Calcium-Imaging-Experimente an kultivierten HT29/B6-Zellen	93
6.5.6. Datenerfassung	94
6.6. siRNA-Experimente mit HT29/B6-Zellen	95
6.6.1. Theorie der siRNA-Transfektion	95
6.6.2. Theorie der Hemmung der Translation durch siRNAs	97
6.7. Statistik	99

1. Inhaltverzeichnis

7. Ergebnisse	100
7.1. Expression von STIM- und Orai-Proteinen	100
7.2. Translokation von STIM1 nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung	106
7.3. Apikaler gegen basolateraler Ca^{2+} -Influx: Ussingkammer-Experimente	114
7.4. Die Beteiligung des Zytoskelettes	119
7.5. Calcium-Imaging Experimente an HT29/B6-Zellen	123
7.6. Immunhistochemische Färbung von HT29/B6-Zellen	129
8. Diskussion	132
8.1. Expression von STIMs und Orais im Kolonepithel	132
8.2. Translokation nach Ca^{2+} -Speicherentleerung	136
8.3. Bedeutung von apikalem und basolateralem kapazitivem Ca^{2+} -Einstrom für das Kolonepithel	137
8.4. Warum ist der kapazitative Calciumeinstrom über die apikale Membran so gering?	145
8.5. Die Rolle des Zytoskelettes bei der Translokation von STIM1	148
8.6. siRNA-Experimente an HT29/B6-Zellen	151
9. Zusammenfassung	153
10. Summary	154
11. Abbildungsverzeichnis	155
12. Tabellenverzeichnis	160
13. Literaturverzeichnis	161
14. Danksagung	196
15. Curriculum vitae	197

1. Inhaltverzeichnis

16. Erklärung	200
---------------	-----

2. Abkürzungsverzeichnis

2. Abkürzungsverzeichnis

Δ	Änderung eines Parameters (Delta)
A	Alanin
ABC	ATP-binding cassette
ADP	Adenosin-3',5'-Diphosphat
Ago	Argonaute
2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
AM	Acetoxymethylester
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARC	Arachidonat-regulierter Ca^{2+} -Kanal
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ATP	Adenosin-3',5'-Triphosphat
BK_{Ca}	large-conductance calcium-activated potassium channel
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	base pairs
CaCCs	Calcium-activated Chloride channels
CAD	CRAC Activation Domain
CaM	Calmodulin
CaMK	Calmodulinkinase
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cADPR	Cyclische Adenosindiphosphoribose
CC1	Coiled-coil domain 1
CCD	charge coupled device
cEF	canonical EF-hand
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CGN	cis-Golgi-Netzwerk
CIF	Calcium-influx factor
CICR	Calcium-induced Calcium release
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat

2. Abkürzungsverzeichnis

CK	Caseinkinase
COP	coat protein complex
CPA	Cyclopiazonsäure
CRAC	Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺
CRACM	CRAC channel modulator (= Orai)
CYP	Cytochrom P450
DAG, DG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol Dilactat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRA	downregulated in adenoma
dsRNA	double-stranded RNA
E	Glutamate
EC	Enterochromaffin
EDTA	Ethylendiamino-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol bis-(β-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure
ENaC	epithelialer Natrium-Kanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum-associated degradation
ERM	ezrin/radixin/moesin
Fab	Antigenbindende Region eines Antikörpers
Fc	Kristalline Region eines Antikörpers
Fcγbp	Fc-γ binding protein
Gi	inhibitorisches G-Protein
Glut	glucose transporter
GPCR	G-protein-coupled receptor
Gt	Gewebeleitfähigkeit
GTP	Guanosin-3',5'-Triphosphat
hEF	hidden EF-hand
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
5-HT	5-hydroxytryptamine, Serotonin

2. Abkürzungsverzeichnis

ICAM-2	intercellular adhesion molecule-2
IgG	Immunglobulin G
InaD	inactivation-no-afterpotential D
Isc	Kurzschlussstrom
IP ₃	Inositol-1, 4, 5-Trisphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor
K	Lysin
Kd	Dissoziationskonstante
L	Leucin
MAM	mitochondria-associated ER-membrane
MC	mitochondrial carrier
MCU	mitochondrial Calcium uniporter
MDR-1	multidrug resistance 1
MOCC	Mechanical-operated Calcium-channel
miRNA	micro-RNA
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MUC	mucin glycoprotein
n	Anzahl
NAADP	nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
NCCE	non-capacitative calcium entry
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
NGS	Ziegenserum
NKCC1	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ co-transporter 1
nt	Nucleotid
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PB	Phosphatpuffer
Pd	Potentialdifferenz
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran

2. Abkürzungsverzeichnis

PMCA	Plasmamembran Calcium ATPase
Pro	Prolin
PtdEtn	Phosphatidylethanolamine
PTP	permeability transition pore
R	Arginin
RELM β	resistin-like molecule β
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA interference
ROCC	Receptor-operated calcium channel
ROI	Region of interest
Rt	Gewebewiderstand
RyR	Ryanodin receptor
SAM	sterile- α -motif
SCaMPER	sphingolipid calcium release-mediating protein of the endoplasmic reticulum
SEM	Standardfehler des Mittelfehlers (Standard error of the mean)
Ser	Serin
SERCA	sarcoplasmatische-endoplasmatische Retikulum Calcium-ATPase
siRNA	Small interfering RNA
SK _{Ca}	small-conductance calcium-activated potassium channel
SOAR	STIM1 Orai Activating Region
SOCC	store-operated Ca ²⁺ -channel
SOCE	Store-operated calcium entry
SPCA	secretory-pathway calcium-transport ATPase
SR	Sarcoplasmatisches Retikulum
STIM	Stromal interaction molecule
TFF	trefoil factor peptide
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TRIC	trimeric intracellular cation
TRPC	transient receptor potential canonical (oder channel)
UPR	unfolded protein response
VGCC	Voltage-gated Calcium channel

2. Abkürzungsverzeichnis

VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
Vol/Vol	Volumenanteil (Volumen/Volumen)
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

3. Einleitung

1.1. Das Kolon – Funktion und Morphologie der Epithelzellen

Das Kolon ist der mittlere Abschnitt des Dickdarms der Säugetiere. Es beginnt nach dem Caecum und geht an seinem Ende in das Rectum über. Das Kolon stellt den letzten Teil des Verdauungssystems dar. Innen ist die Kolonschleimhaut von einem Epithel ausgekleidet, das eine wichtige Rolle für Resorptions- und Sekretionsvorgänge in diesem Organ spielt. Morphologische Untersuchungen lassen mindestens drei verschiedene Zelltypen im Dickdarmepithel der Säuger unterscheiden. Das sind die eigentlichen Enterozyten (columnar epithelial cells), die schleimbildenden Becherzellen (mucous oder goblet cells) und die hormonbildenden chromaffinen Zellen (Chang, Leblond 1971; Tsubouchi, Leblond 1979; Rijke et al. 1979) (Abb. 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5). Sie formen Krypten und das Oberflächenepithel (Abb.3-1).

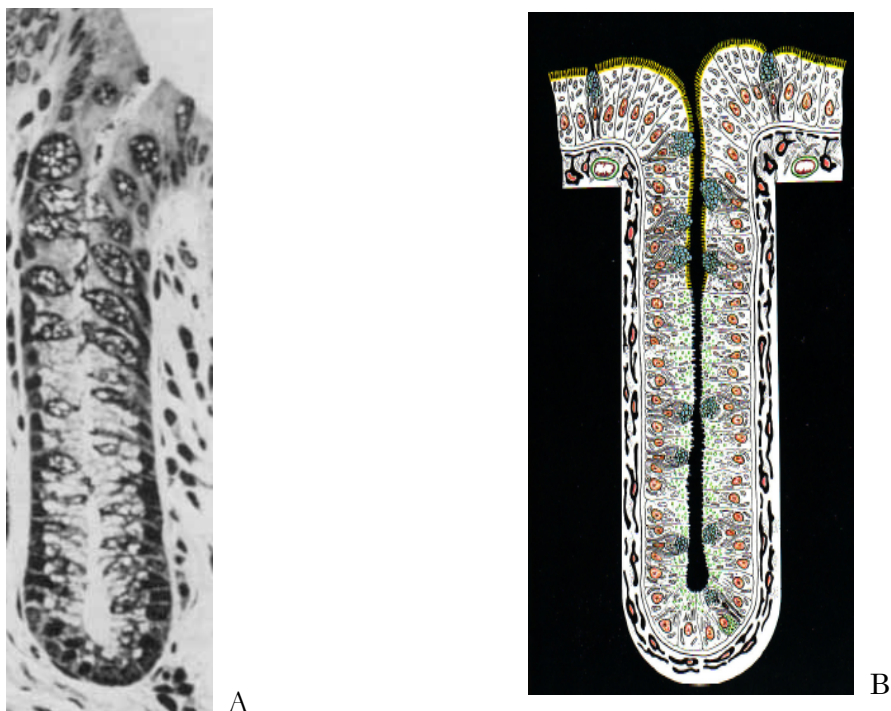


Abb. 3-1: Das Kryptenepithel des Kolons. A.: Aus (Chang, Leblond 1971) B.: Aus (Specht 1977). A ist ein Foto und B ist ein schematisches Bild einer Krypte. Die Krypte enthält Becherzellen (mit blau dargestellten Vesikeln), chromaffine Zellen (mit grün dargestellten Vesikeln) und die eigentlichen Enterozyten, deren apikale Membran durch Mikro villi (gelb) vergrößert ist.

3. Einleitung

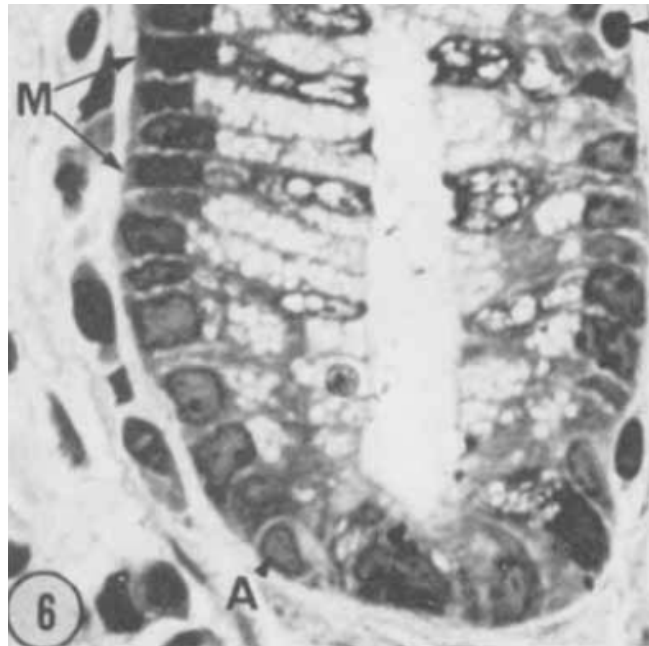


Abb. 3-2: Becherzellen (mit M markiert, siehe Pfeile) in einer Krypte .

Aus (Chang, Leblond 1971)

Becherzellen liegen in den Krypten und im Oberflächenepithel (Abb. 3-2). Sie synthetisieren sekretorische Mucine wie MUC2 (mucin glycoproteins) und bioaktive Moleküle wie MUC1, MUC3, MUC17 (so genannte epithelial membrane-bound mucins), TFP (trefoil factor peptides), RELM β (resistin-like molecule β) und Fc γ bp (Fc- γ binding protein) um eine Mucosa schützende Schleimschicht (Abb. 3-3) aufzubauen (Kim, Ho 2010). Die Hauptkomponente von Schleim ist Mucin. Es besteht aus großen Glykoproteinen mit einem hohen Oligosaccharidanteil, woraus eine Gel-ähnliche Struktur resultiert (Hollingsworth, Swanson 2004; Andrianifahanana et al. 2006). Die Schleimschicht behindert unter anderem den direkten Kontakt von kommensalen Bakterien, die in hoher Dichte im Kolonlumen vorkommen, mit den Epithelzellen (Lievín-Le Moal, Servin 2006; Dharmani et al. 2009) (Abb. 3-3).

3. Einleitung

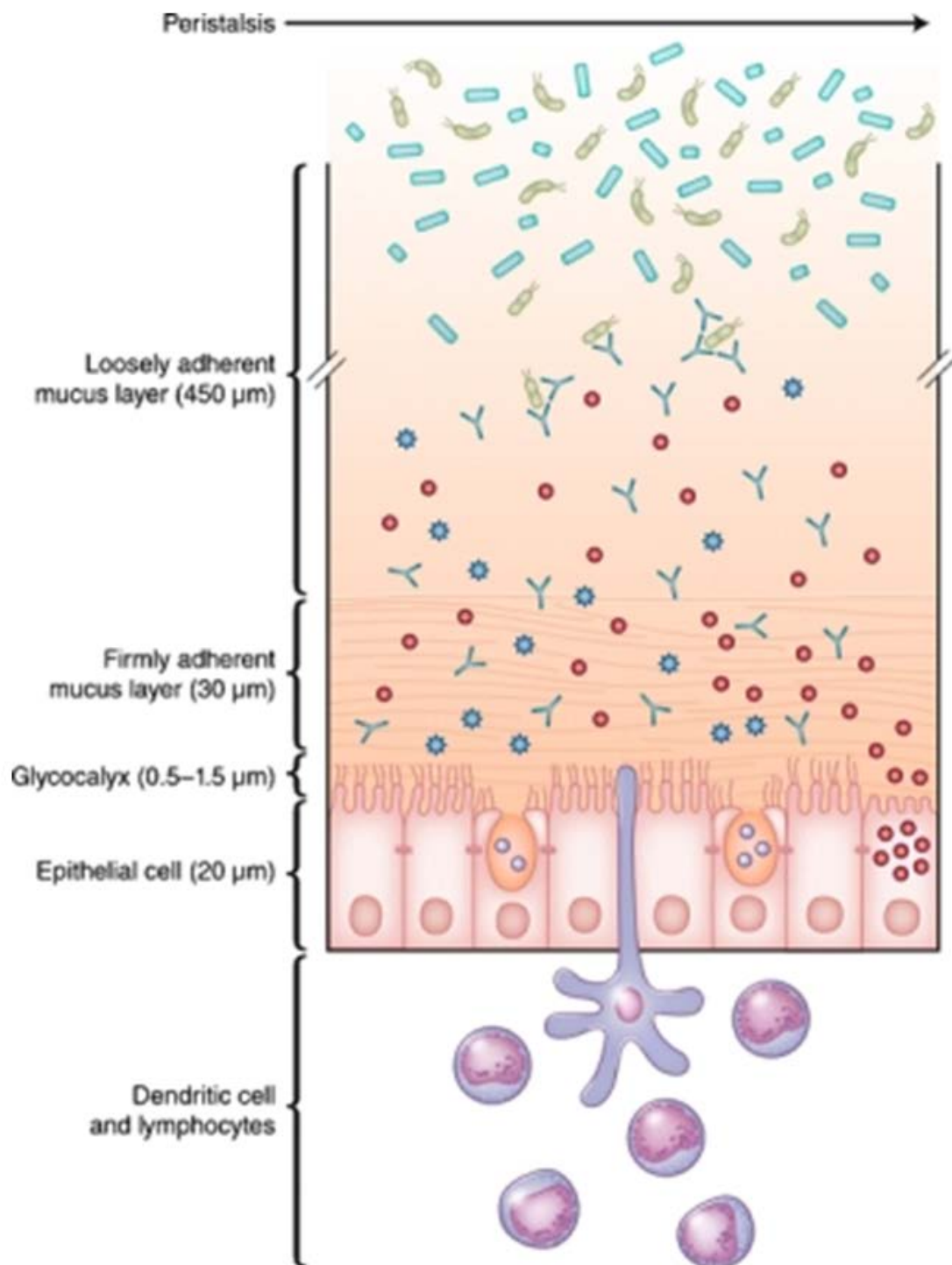


Abb. 3-3: Schematische Darstellung der Darmschleimschicht sowie der Schleimkomponenten MUC2 sowie MUC3.

Aus (Kim, Ho 2010)

3. Einleitung

Enterochromaffine Zelle (EC-Zellen) (Portela-Gomes et al. 1984) machen etwa 5 % der Kolonepithelzellen aus (Kunzelmann, Mall 2002) (Abb. 3-4). Sie produzieren Peptidhormone und andere Botenstoffe wie Serotonin (Erspamer, Asero 1952; Furubayashi et al. 1978), dem eine Rolle bei der Regulation der Darmmotilität (Bülbring, Gershon 1967; Furubayashi et al. 1978) und des Ionentransports zukommt (Kuramoto et al. 2007).

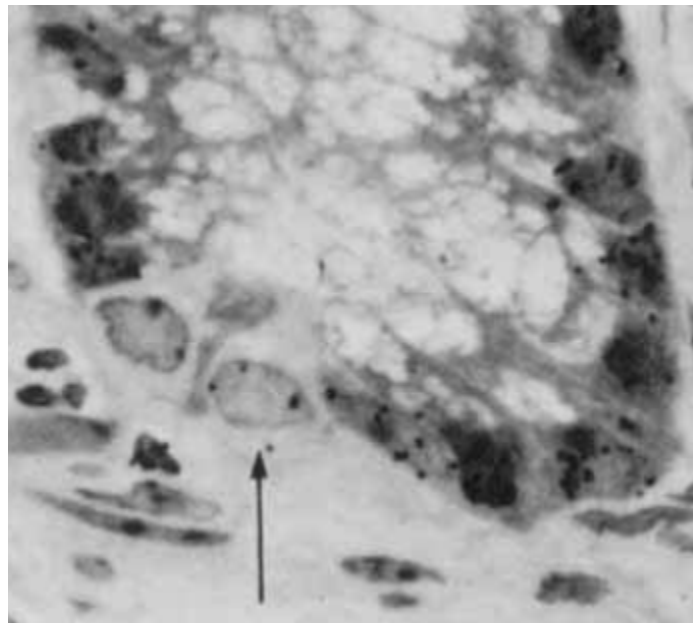


Abb. 3-4: Enterochromaffine Zelle (Pfeil) in der Fundusregion einer Krypte.

Aus (Chang, Leblond 1971)

Enterozyten (columnar epithelial cells) (Abb. 3-5) sind Epithelzellen, deren Höhe mindestens viermal größer ist als ihre Breite (Kunzelmann, Mall 2002). Sie machen den größten Teil des Kolonepithels aus und dienen der Resorption und Sekretion von Ionen und Wasser.

3. Einleitung



Abb. 3-5: Enterozyt (Markierung mit CC (mit Rot markiert) für columnar cell).

Aus (Schofield, Atkins 1970)

Makroskopisch unterscheidet man am Kolonepithel Krypten und Oberflächenepithel. Die Epithelzellen in diesen beiden Bereichen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Differenzierung, dem Proliferationsverhalten und auch ihrer funktionellen Eigenschaften (Rijke et al. 1979; Rousset 1986; Ho 1992; Horster et al. 1994; Hermiston, Gordon 1995). Die höchste proliferative Aktivität findet man in den basalen Bereichen der Krypten. Dort ist auch die Expression von Differenzierungsmarkern am niedrigsten. Diese Zellen besitzen eine hohe sekretorische Aktivität, z.B. in Form einer Chloridsekretion. Dagegen zeigen die oberflächlichen Epithelzellen eine niedrige Tendenz zur Vermehrung, eine starke Expression von Differenzierungsmarkern und Lektinen und resorbieren vor allem Ionen und Wasser (Abb. 3-6) (Ho 1992; Kockerling et al. 1993; Hermiston, Gordon 1995). Während der Wanderung der bei der Teilung von Stammzellen, die nahe dem Fundus der Krypten gelegen sind, entstehenden Tochterzellen kommt es also zu einer zunehmenden Differenzierung der Zellen. Im Oberflächenbereich werden die Zellen dann durch Apoptose abgestoßen (Bleich et al. 1996; Ecke et al. 1996a; Ecke et al. 1996b) (Abb. 3-6).

3. Einleitung

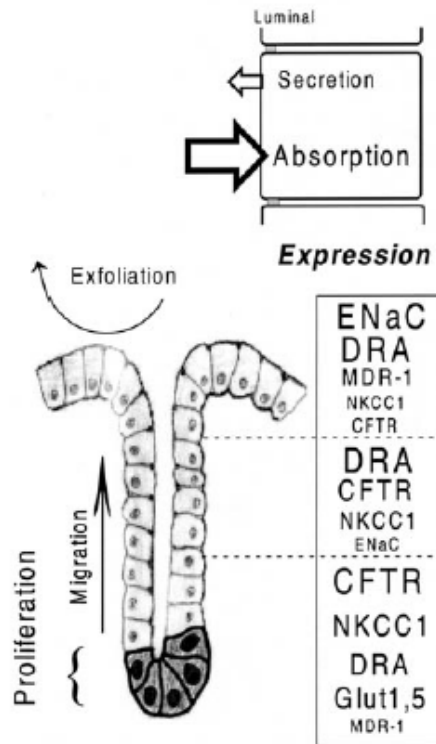


Abb. 3-6: Zelluläres Modell der Verteilung von Ionentransportern an einer Kolonkrypte.

Aus (Kunzelmann, Mall 2002)

ENaC: epithelial sodium channel

DRA: downregulated in adenoma

MDR-1: multidrug resistance 1

NKCC1: $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter 1

CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Glut: glucose transporter

Der Hauptteil der Resorption organischer Substanzen sowie auch der größte Teil der Wasser- und Elektrolytresorption spielt sich im Dünndarm ab. Das Kolon hat aber die Fähigkeit, Wasser und Ionen wie Natrium oder Chlorid aufzunehmen und kann im Unterschied zum Dünndarmepithel den Darminhalt eindicken (Turnberg 1970). Etwa 90 % der Flüssigkeit der Faeces, die aus dem Dünndarm in den Dickdarm gelangt, wird im Kolon resorbiert (Kunzelmann, Mall 2002). Dazu sind die Epithelzellen (insbesondere die

3. Einleitung

Enterozyten) mit Ionentransportern in ihrer apikalen und basolateralen Membran ausgestattet. Deren Expression unterscheidet sich zwischen proximalen und distalen Anteilen des Kolons sowie zwischen Oberflächen- und Kryptenepithel (Abb. 3-7).

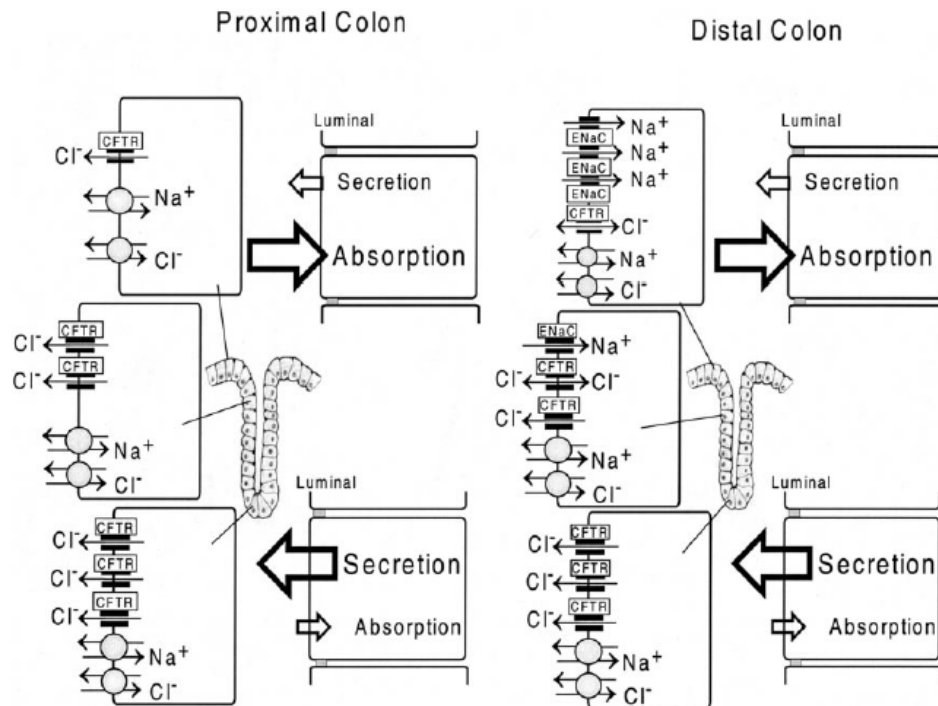


Abb. 3-7: Modelle für den Elektrolyt-Transport im proximalen und distalen Kolonepithel.

Aus (Kunzelmann, Mall 2002)

ENaC: epithelial sodium channel

CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

So gibt es eine elektroneutrale NaCl-Resorption durch parallel geschaltete Na^+/H^+ - und Cl^-/HCO^- -Austauscher in der apikalen Membran sowohl im Oberflächen- wie auch im Kryptenepithel. Eine elektrogene Resorption von Na^+ über den so genannten ENaC (epithelial sodium channel) findet man dagegen nur im Oberflächenepithel und im oberen, also lumennahen Teil der Krypten. Ein zentraler Ionenkanal für die Sekretion von Chlorid stellt der CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) in der apikalen Membran dar. Seine Expression nimmt in der Tiefe der Krypten zu. Transporter und Kanäle ermöglichen den Kolonepithelzellen Wasser und Ionen effizient aufzunehmen bzw. zu

3. Einleitung

sezernieren.

1.2. Calcium als intrazellulärer Botenstoff

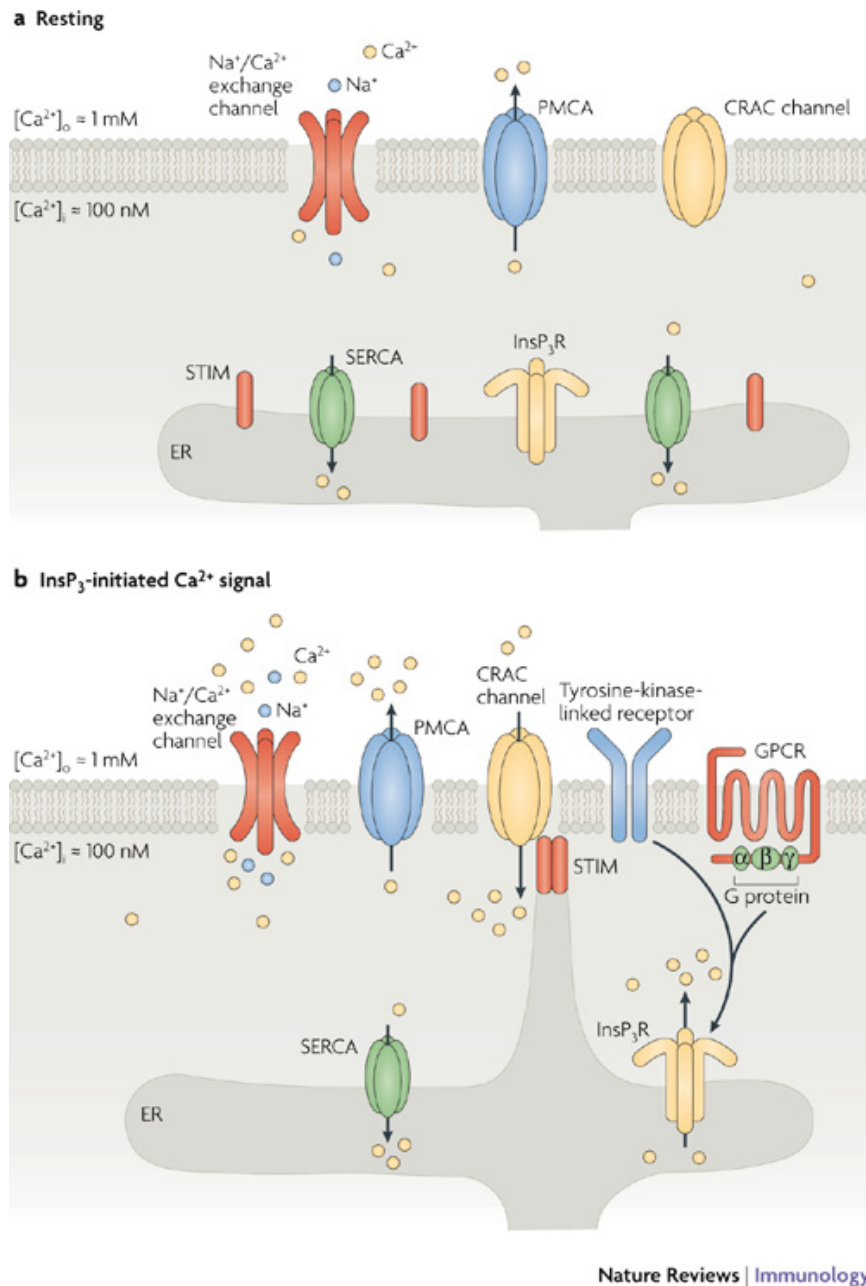
Calciumionen dienen in der Zelle als Signalmoleküle bei allen bekannten Lebensformen (Berridge 1997). Calcium steuert – um nur einige zu nennen – verschiedene Zellfunktionen, zum Beispiel Muskelkontraktionen (Ebashi, Endo 1968), Informationsverarbeitung im Gehirn (Kawamoto et al. 2012) und Immunreaktionen (Feske 2011). Die Funktion von Calcium als intrazellulärer Botenstoff für erregbare Gewebe wurde bereits Ende des 19. Jahrhundert erkannt (Ringer 1883) und dann auf nichterregbare Gewebe ausgedehnt (Brini, Carafoli 2000). So spielt das Ion eine Rolle zum Beispiel bei der Proliferation von Zellen (El et al. 2010), der Entwicklung und Differenzierung von Zellen und beim Zelltod (Berridge et al. 2000; Berridge 2004; Flourakis et al. 2010). Dabei kommt es in der Regel zu Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die sich in Raum, Zeit und Amplitude unterscheiden, so dass ein und derselbe Botenstoff innerhalb einer Zelle ganz unterschiedliche Prozesse beeinflussen kann (Bootman et al. 2001a). Viele Zellfunktionen benötigen deshalb die Verfügbarkeit von extrazellulärem oder intrazellulärem Calcium (Douglas, Poisner 1963; Nielsen, Petersen 1972). Es sind Calciumwellen bekannt (Berridge et al. 1998), die räumlich begrenzt bleiben, und solche, die sich über die gesamte Zelle oder sogar zellübergreifend auf Nachbarzellen ausbreiten. Zeitlich betrachtet kann es sich um vorübergehende Wellen handeln oder solche, die über längere Perioden bestehen bleiben (Petersen et al. 1994).

Bei solchen Calciumsignalen kommt es zu einem Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels auf Werte von maximal etwa 10^{-6} mol/l, das ist deutlich höher als die basale zytosolische Calcium-Konzentration in Ruhe mit einem Wert von etwa 10^{-7} mol/l (Tsien et al. 1982; Mikoshiba 2007). Änderungen der zytosolischen Calciumkonzentration als Signal in einer Zelle müssen schnell und kontrolliert erfolgen, da ein übermäßiger Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration toxisch auf eine Zelle wirkt (Rasmussen et al. 1990; Mikoshiba 2007). Aus diesem Grund besitzen die Zellen Organellen wie das endoplasmatische (bei Muskeln: sarkoplasmatische) Retikulum (ER/SR) (Stokes, Wagenknecht 2000; Ong et al. 2007), Mitochondrien (Duchen 1999, 2000) und den Golgi-Apparat (Zha et al. 1995), die die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kontrollieren. Vor allem das endoplasmatische Retikulum ist für die Speicherung von Ca^{2+} verantwortlich. Die

3. Einleitung

Aufnahme von Ca^{2+} in diese Organelle erfolgt durch Sarkoplasmatische-endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPasen (SERCA), die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind (Gélébart et al. 2002; Satoh et al. 2011). Beim Golgi-Apparat übernehmen diese Funktionen die so genannten secretory pathway calcium ATPasen (SPCA) (van Baelen et al. 2004). Ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Rückführung des zytosolischen Calciums in intrazelluläre Speicher spielen die Mitochondrien. Mit ihrem in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU) werden Calciumionen entlang des elektrochemischen Gradienten aufgenommen (Kirichok et al. 2004; Baughman et al. 2011). Außerdem können Calciumionen über die Plasmamembran in den Extrazellulärraum geschleust werden, z.B. über $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) (Palty, Sekler 2012). Die gleiche Funktion erfüllt eine ATP-verbrauchende Ca^{2+} -Pumpe in der Plasmamembran (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, PMCA) (Cartwright et al. 2011) (Abb. 3-8).

3. Einleitung



Nature Reviews | Immunology

Abb. 3-8: Verschiedene Calciumtransporter in einer Zelle.

Aus (Scharenberg et al. 2007)

PMCA: plasma membrane calcium ATPase

CRAC channel: Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel

GPCR: G-protein-coupled receptor

STIM: stromal interaction molecule

SERCA: sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

InsP₃R: Inositol-1, 4, 5-trisphosphate receptor

3. Einleitung

Verändern sich allerdings die Natrium- oder Calcium-Gradienten entlang der Plasmamembran oder auch das Membranpotential, kehrt sich die Transportrichtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers um und er transportiert Ca^{2+} in die Zelle hinein (Blaustein, Lederer 1999). Neben den erwähnten Pumpen und Kanälen sind auch Ca^{2+} -bindende Proteine wichtig für die Calcium-Speicherung (Bauer et al. 2008; Konno et al. 2012). Diejenigen, die im Lumen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind, gehören zur Calsequestrin- (Novak, Soukup 2011) und Calreticulin-Familie (Michalak et al. 2009). Sie sind mit zwei Basisfunktionen im Hinblick auf eine dynamische Calcium-Speicherung ausgestattet: hohe Bindungskapazität (25 – 50 mol Ca^{2+} /mol Protein) und niedrige Affinität (K_d im millimolaren Bereich) (Pozzan et al. 1994). Ein wichtiges zytosolisches Ca^{2+} -bindendes Protein ist das Calmodulin, welches als Calcium-Sensor agiert und Signale vermittelt (Chin, Means 2000; Zhang et al. 2012). Dazu kommen die STIM (stromal interacting molecule) Proteine als Ca^{2+} -bindende Proteine, die in 3.5. (STIM und Orai – intrazellulärer Calcium-Sensor und speichergesteuerte Kanäle) näher beschrieben werden.

Für die schnelle Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels sind ebenfalls mehrere Mechanismen miteinander verknüpft. Der Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) -Signalweg ist einer der wichtigsten in diesem Zusammenhang. Zum Beispiel kommt es durch Bindung von Acetylcholin an muscarinerge Rezeptoren vom Typ M_3 in der basolateralen Membran der Kolonepithelzellen intrazellulär zu einer Aktivierung einer Phospholipase C, die die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert (Berridge 1984). IP_3 bindet daraufhin an seinen Rezeptor, den intrazellulären IP_3 -Rezeptor, der auf Calciumspeicherorganellen lokalisiert ist und als Ca^{2+} -Kanal funktioniert (Streb et al. 1983; Joseph et al. 1984) (Abb.3-9).

3. Einleitung

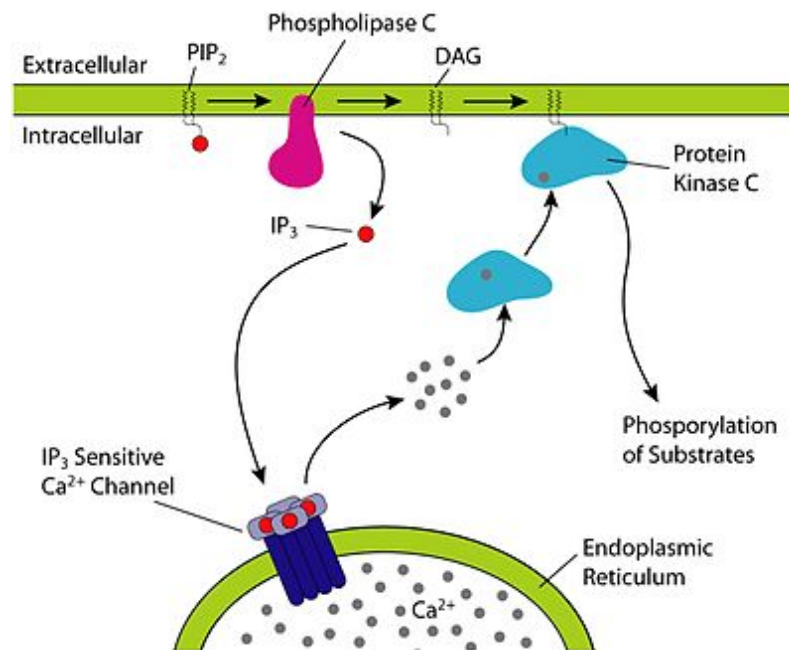


Abb. 3-9: IP₃-Signalweg.

Aus: wikipedia.de.

PIP₂: Phosphatidylinositol-4, 5-Biphosphat

DAG: Diacylglycerol,

IP₃: Inositol-1, 4, 5-Trisphosphat

IP₃-Rezeptoren sind Tetramere, die aus homogenen oder heterogenen Untereinheiten zusammengesetzt sind, welche windmühlenartig mit einer zentralen Pore angeordnet sind (Taylor et al. 2004; Mikoshiba 2007). Es sind drei Subtypen bekannt (IP₃-Rezeptor 1 bis 3) (Taylor, Laude 2002), die von drei verschiedenen Genen codiert (Sugiyama et al. 1994) und gewebespezifisch exprimiert werden (Zhang et al. 2011). Ihre Primärstruktur beinhaltet konstante Regionen und solche, die variabel sind. In diesen Abschnitten sind die regulativen Domänen des Rezeptors lokalisiert, wie die Ca²⁺- und die ATP-bindende Region (Abb. 3-10).

3. Einleitung

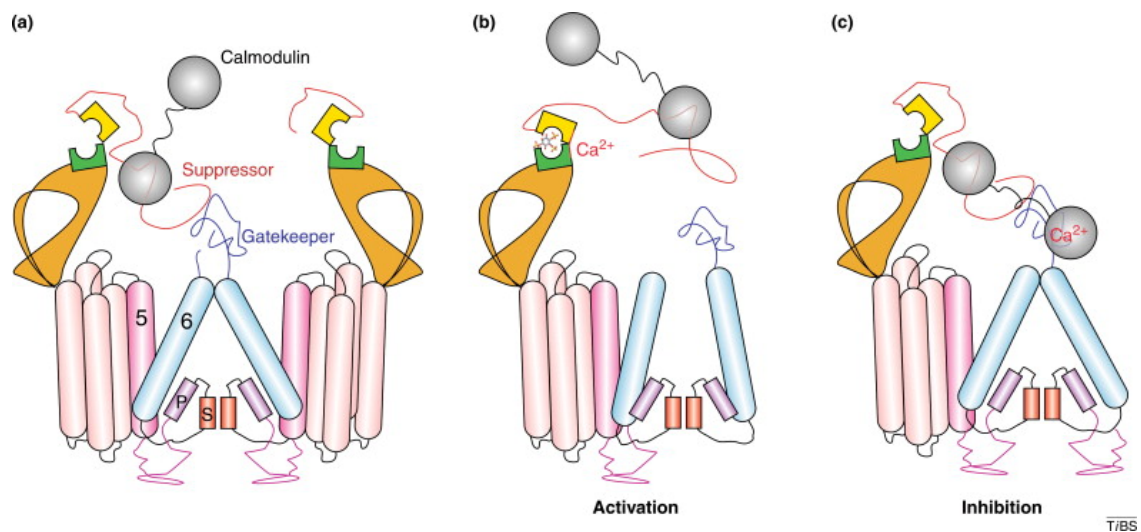


Abb. 3-10: Ein Model für Aktivierung von IP₃-Rezeptoren.

Aus (Taylor et al. 2004)

Die Regulation durch Calciumionen stellt sich biphasisch dar: niedrige Konzentrationen aktivieren den Rezeptor, hohe hemmen ihn (Patterson et al. 2004). Die Wirkungsweise von ATP ist ähnlich (Maeda et al. 1991), denn niedrige Konzentrationen führen zur Aktivierung des IP₃-Rezeptors, millimolare Konzentrationen führen eine Hemmung herbei (Bezprozvanny 2005).

Hat eine Ca²⁺-Freisetzung über den IP₃-Signalweg stattgefunden, kommt es häufig zur Aktivierung der Ryanodinrezeptoren (RyR) und damit zu einer Ca²⁺-induzierten Ca²⁺-Freisetzung (Ca²⁺-induced Ca²⁺ release, CICR) (Leite et al. 2002). Durch diesen Mechanismus wird das initiale IP₃-Signal verstärkt (Vinogradova et al. 2005; Iino 2007). Eine direkte Aktivierung des Ryanodinrezeptors durch seine physiologischen Agonisten zyklische Adenosindiphosphoribose (cADPR) (Galione 1994; Mészáros et al. 1993) und Arachidonsäure sind ebenfalls möglich (Woolcott et al. 2006). Zudem wurden kürzlich Faktoren, die die Funktion der Ryanodinrezeptoren unterstützen, gefunden, nämlich junctophilin und TRIC (trimeric intracellular cation)-Kanäle. Sie werden vor allem im Herzmuskel exprimiert (Yamazaki et al. 2009).

Ein weiterer Rezeptortyp, der in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, ist das sphingolipid calcium-mediating protein (SCaMPER). Es ist ein

3. Einleitung

Ca^{2+} -Kanal, der von Sphingolipiden aktiviert wird (Kim et al. 1995). SCaMPER hat keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem IP_3 - oder dem Ryanodinrezeptor und ist mit einem Molekulargewicht von 20000 Da wesentlich kleiner als diese (Mao et al. 1996). Obwohl es in sehr vielen Geweben exprimiert wird, ist über seine physiologische Funktion nur wenig bekannt (Cavalli et al. 2003). Außerdem kann Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP) eine Ca^{2+} -Freisetzung auslösen, wobei die Funktion von IP_3 - und den Ryanodinrezeptoren gefördert wird (Guse, Lee 2008; Patel et al. 2011).

Eine weitere Quelle, aus der Calciumionen für Ca^{2+} -abhängige Signale stammen können, ist der Extrazellulärraum. Auf der Plasmamembran befinden sich eine Reihe von Kanälen, die alle zum Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in das Zytoplasma beitragen. Die speichergesteuerten Calciumkanäle (store-operated Ca^{2+} channels, SOCCs oder SOCE channels) öffnen sich, wenn die Ca^{2+} -Konzentration im endoplasmatischen Retikulum sinkt (Parekh, Putney 2005). Dieser Mechanismus wird auch als kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom bezeichnet. Zwei Proteine spielen dabei eine zentrale Rolle: STIM und Orai (Smyth et al. 2010) (siehe auch 3.5.). Stromal interacting molecule 1 (STIM1) trägt dabei die Rolle des Calcium-Sensors im endoplasmatischen Retikulum, während Orai1 den Ca^{2+} -Kanal (oder Teile davon) bildet. Neben diesem Rezeptortyp wurde noch ein so genannter NCCE (non-capacitative calcium entry) beschrieben (Harper et al. 2010). Er ist zum Beispiel an Blutplättchen bekannt und wird durch Proteinkinase C aktiviert (Rosado, Sage 2000b). Speichergesteuerte und nichtkapazitative Ca^{2+} -Kanäle sind nicht simultan aktiv; der zuletzt genannte ist für den Ca^{2+} -Eintritt zuständig, wenn der spezifische Stimulus gering ist und geht dann auf die speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanäle über, sobald der Stimulus stärker und das endoplasmatische Retikulum entleert wird.

Weiterhin sind rezeptorgesteuerte Calciumkanäle (receptor-operated Ca^{2+} channels, ROCC) in der Plasmamembran von sekretorischen Zellen und Neuronen bekannt (Almirza et al. 2012). Sie öffnen sich, wenn ein externer Ligand bindet, wodurch es zu einem schnellen Einstrom von Ca^{2+} kommt (Suzuki 1985; Mulryan et al. 2000; McFadzean, Gibson 2002). In vielen Zellen sind auch mechanisch aktivierte Ca^{2+} -Kanäle (MOCCs) vorhanden, die sich öffnen, sobald die Zelle deformiert wird (Tsien, Tsien 1990; Bootman et al. 2001b). In erregbaren Zellen kommen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (voltage-gated Ca^{2+} channels, VGCCs) hinzu (Oda et al. 2010). Sie werden aber in Epithelien als nichterregbaren Zellen nicht gefunden; hier spielen speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle anscheinend die Hauptrolle

3. Einleitung

beim Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum.

1.3. Intrazelluläre Ca^{2+} - Speicher

Wie oben beschrieben ist Calcium ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff, aber gleichzeitig ist es ein Zellgift (Rasmussen et al. 1990; Mikoshiba 2007). Deshalb besitzen Zellen intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher wie den Golgi-Apparat, die Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum.

Der Golgi-Apparat wurde im Jahr 1898 von dem Physiologen Camillo Golgi entdeckt (Fabene, Bentivoglio 1998). Der Golgi-Apparat (Abb. 3-11) besteht aus vier bis sechs membranumschlossenen, meist flachen Hohlräumen, die als Zisternen bezeichnet werden. In der Regel bilden je drei bis acht, selten bis zu 30 dieser Zisternen einen Stapel mit durchschnittlich 1 μm Durchmesser, der als Dictyosom bezeichnet wird. Je nach Zelltyp enthält der Golgi-Apparat ein bis mehrere Hundert Dictyosomen. Der Golgi-Apparat befindet sich meist nahe dem Zellkern und dem Zentrosom, was durch Mikrotubuli gewährleistet wird. Die relative Ausdehnung des Golgi-Apparates in der Zelle hängt eng mit ihrer Aktivität und Funktion zusammen und kann innerhalb einer Zelle temporär variieren.

3. Einleitung

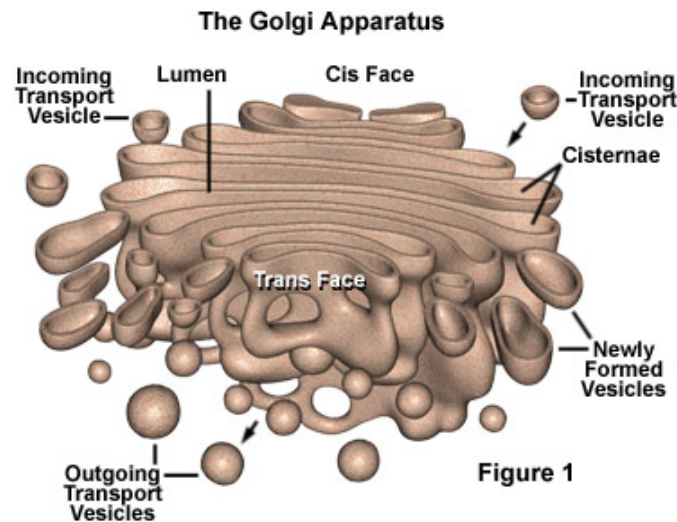


Abb. 3-11: Golgi-Apparat.

Aus <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/golgi/golgiapparatus.html>

Am Golgi-Apparat lässt sich eine eindeutige Polarisierung feststellen. Er hat drei Seiten nämlich Cis, Medial und Trans (Dunphy, Rothman 1985) (siehe auch Abb. 3-11, 3-12). Die Seite, die dem endoplasmatischen Retikulum zugewandt ist und abgeschnürte Vesikel von diesem empfängt, welche mit dem Hüllprotein COP II (coat protein complex II) besetzt sind, nennt sich cis-Golgi-Netzwerk (CGN) (Nakano, Luini 2010), sie ist konvex. Ebenfalls können Vesikel vom cis-Golgi-Netzwerk zum endoplasmatischen Retikulum abgegeben werden, hierfür werden die Vesikel mit einem anderen Hüllprotein (COP I) versehen (Glick, Malhotra 1998). Die Seite, die dem endoplasmatischen Retikulum ab- und eher der Plasmamembran zugewandt ist, wird als trans-Golgi-Netzwerk (TGN) (Nakano, Luini 2010) bezeichnet, sie ist konkav geformt. Hier werden so genannte Golgi-Vesikel abgeschnürt (Glick, Malhotra 1998) (Abb. 3-12).

3. Einleitung

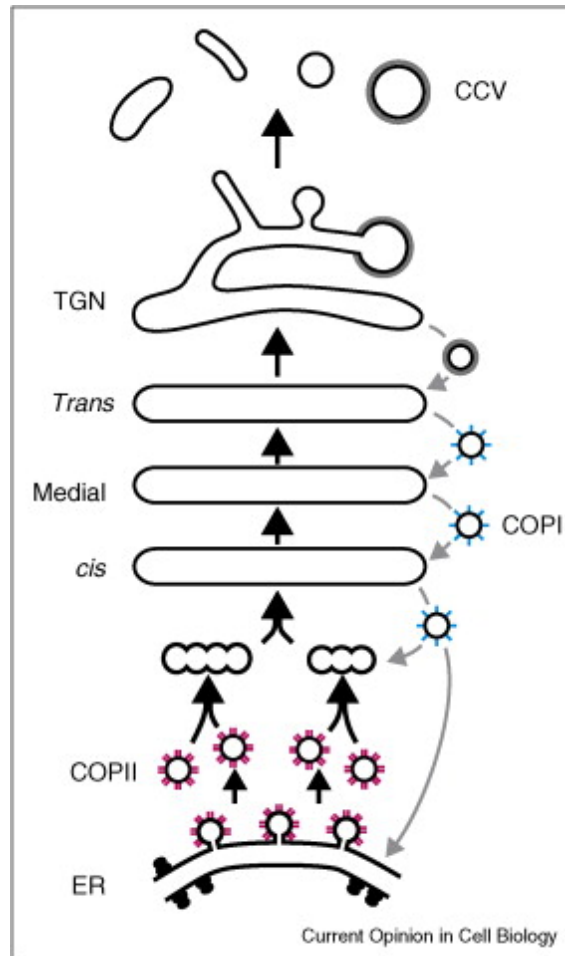


Abb. 3-12: Modell des vesikulären Transports zwischen endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparat.

Aus (Nakano, Luini 2010)

COP: coat protein complex

CGN: cis-Golgi-Netzwerk

TGN: trans-Golgi-Netzwerk.

Neben der Synthese und der Modifizierung von Elementen der Plasmamembran oder der Bildung von lysosomalen Proteinen hat der Golgi-Apparat noch eine weitere wichtige Funktion: er dient als Ca^{2+} -Speicher (He, Hu 2012). Der Golgi-Apparat ist ein Agonist-sensibler intrazellulärer Calcium-Speicher (van Baelen et al. 2004). Er kann etwa 5 % des gesamten von einer Zelle gespeicherten Ca^{2+} enthalten (Chandra et al. 1991). Zur Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Zytosol besitzt er SERCA- und SPCA-Pumpen (Wuytack et al.

3. Einleitung

2003). Beide Transportenzyme unterscheiden sich pharmakologisch: SERCAs werden durch Thapsigargin gehemmt, SPCA nicht (Vanoevelen et al. 2004).

Der Golgi-Apparat, der basal eine Calciumionenkonzentration von etwa 0,3 mmol/l aufweist, kann genau wie auch das endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} nach Stimulation einer Zelle freisetzen (Pinton et al. 1998). Dazu ist er mit IP_3 -Rezeptoren ausgestattet (Lin et al. 1999).

Obwohl der Golgi-Apparat ähnlich wie das endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -Pumpen besitzt, ist seine Bedeutung für die Absenkung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels nach einer Stimulation einer Zelle geringer als die des endoplasmatischen Retikulums, da die Ca^{2+} -Aufnahme in den Golgi-Apparat schneller inaktiviert (Missiaen et al. 2004). Während die Teile des Golgi-Apparats, die mit SERCAs ausgestattet sind, sowohl als Ca^{2+} -Speicher wie auch als Ca^{2+} -freisetzende Organellen während des Ca^{2+} -Signalings dienen, geht man davon aus, dass die Teile des Golgi-Apparats, in denen es SPCA gibt (das sind die Golgi-Stacks, TGN und sekretorische Vesikel), nur als Ca^{2+} -Speicher fungieren (Missiaen et al. 2004; Vanoevelen et al. 2004).

Der zweite Typ von Organellen, der an der intrazellulären Kontrolle der Ca^{2+} -Konzentration beteiligt ist, sind die Mitochondrien. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Bereitstellung energiereicher Moleküle, nämlich von Adenosintriphosphat. Dementsprechend befinden sich besonders viele Mitochondrien in Zellen mit hohem Energieverbrauch. Darüber hinaus erfüllen sie weitere Funktionen für die Zelle wie der Regulation von CRAC-Kanälen (Calcium-release activated Ca^{2+} channels), das ist eine besondere Form von speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanälen, die von Lymphozyten bekannt sind (Parekh 2008), oder der Apoptose (Mignotte, Vayssiere 1998). Mitochondrien haben meistens einen Durchmesser von etwa 0,5 – 1,5 μm und zeigen sehr unterschiedliche Formen (Scott, Youle 2010), von Kugeln bis zu komplexen Netzwerken (Peng et al. 2004; Hallman et al. 2006; Li et al. 2008). Die Hülle der Mitochondrien besteht aus einer äußeren und einer inneren Membran (Endo 2008). Beide Membranen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. Durch diese Membranen entstehen vier unterschiedliche Kompartimente: Die äußere Membran, der Intermembranraum (der Raum zwischen den beiden Membranen), die innere Membran (ein Teil formt die Cristae) und die Matrix (der Raum innerhalb der inneren Membran) (Endo 2008) (siehe auch Abb. 3-13).

3. Einleitung

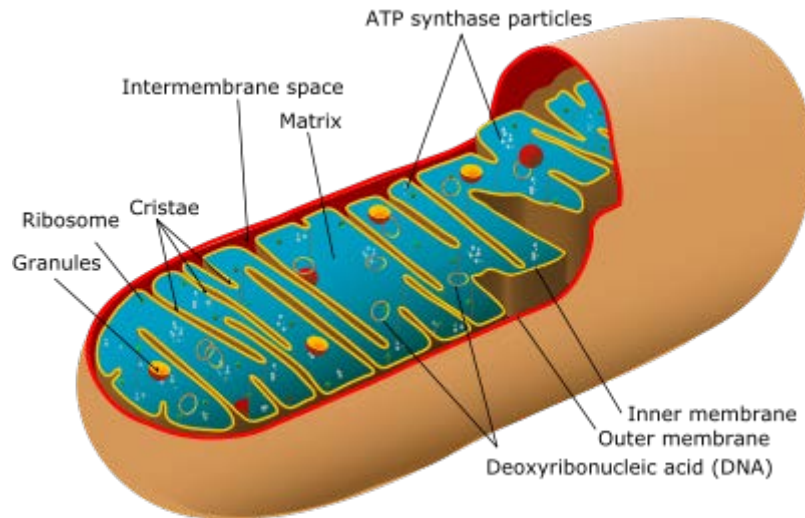


Abb. 3-13: Mitochondrien.

Aus <http://biology.about.com/od/cellanatomy/ss/mitochondria.htm>

In der inneren Membran und in der Matrix findet man eine Vielzahl von (beim Mensch etwa 1500) Proteinen und Enzymen (Taylor et al. 2003) (Abb. 3-13). Sie dienen der oxidativen Phosphorylierung und der ATP-Synthese (Schwerzmann, Pedersen 1986) sowie dem Im- und Export von Substanzen über die mitochondrialen Membranen (Higgins 1992; Dean et al. 2001; Palmieri 2004; Wiedemann et al. 2004; Endo 2008) sowie der Fusion und Spaltung von Mitochondrien (Mihara 2006; Scott, Youle 2010). Im Intermembranraum der Mitochondrien befindet sich das Enzym Cytochrom C (Yamamoto et al. 2010). Bei einer Überladung einer Zelle mit Ca^{2+} öffnet sich die so genannte permeability transition pore (PTP). Sie leitet den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Smaili et al. 2000) und die Cytochrom C-Abgabe ein (Ishida 2004). Folge ist die Einleitung der Apoptose (Zoratti, Szabo 1995; Ishida 2004).

Mitochondrien können aber auch – zumindest vorübergehend – als Calcium-Speicher funktionieren und tragen damit zur Kontrolle der Calcium-Homöostase der Zelle bei. Sie wirken wie eine Art Puffer und dämpfen dadurch Schwankungen des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels (Rossier 2006). Wegen dieser Funktion und auch der physischen und funktionellen Kuppelung können Mitochondrien gemeinsam mit dem endoplasmatischen Retikulum die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kontrollieren (Hajnóczky et al. 2000; Pizzo, Pozzan 2007). Sie besitzen nämlich in ihrer Innenmembran den so genannten

3. Einleitung

mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter (MCU). Er wird hauptsächlich von extramitochondrialem Ca^{2+} aktiviert (Szabadkai et al. 2006) und durch das mitochondriale Membranpotential gesteuert (Gravina et al. 2010). Das Calcium wird aus den Mitochondrien durch Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher oder Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung freigesetzt (Ichas et al. 1997; Poburko et al. 2006).

Die dritte und wahrscheinlich bedeutsamste Zellorganelle, die an der Kontrolle der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beteiligt ist, ist das endoplasmatische Retikulum. Es besteht aus einem weit verzweigten Membran-Netzwerk aus Röhren, Bläschen und Zisternen, die von einer Membran umgeben werden. Das Membranlabyrinth des endoplasmatischen Retikulums macht über die Hälfte der gesamten Membranmenge in einer Eukaryontenzelle aus. Diese Membran geht direkt in die Kernhülle des Zellkerns über, das heißt Kernhülle und endoplasmatisches Retikulum stellen ein morphologisches Kontinuum dar (Chi et al. 2009). Das Lumen des endoplasmatischen Retikulums steht mit dem Membranzwischenraum der Kernhülle, dem perinukleären Raum, in Verbindung (siehe Abb. 3-14).

Die Struktur des endoplasmatischen Retikulums ist dynamisch und einer steten Reorganisation unterworfen (Shibata et al. 2006). In tierischen Zellen erfolgt der Auf- und Umbau des endoplasmatischen Retikulums unter dem dominierenden Einfluss der Mikrotubuli (Grigoriev et al. 2008; Smyth et al. 2010).

Teile des endoplasmatischen Retikulums, das raue endoplasmatische Retikulum, sind auf ihren Membranflächen mit Ribosomen besetzt; andere Bereiche sind glatt und ribosomenfrei (Abb.3-14). Raues und glattes endoplasmatisches Retikulum unterscheiden sich in ihrer Funktion. Das mit Ribosomen besetzte raue endoplasmatische Retikulum dient der Proteinbiosynthese und der Membranproduktion (Shibata et al. 2006). Das glatte endoplasmatische Retikulum spielt eine wichtige Rolle bei mehreren metabolischen Prozessen. Enzyme des glatten endoplasmatischen Retikulums sind von Bedeutung für die Synthese von verschiedenen Lipiden wie Cholesterin (Lange et al. 1999; Maxfield, Wüstner 2002), Phospholipiden (Vance 1990; Lebedzinska et al. 2009) und Steroiden (Black et al. 2005). Weiterhin spielt das glatte endoplasmatische Retikulum eine wichtige Rolle bei der Entgiftung mittels Cytochrom P450 (CYP) (Avadhani et al. 2011). Außerdem dient es als Calcium-Speicher.

3. Einleitung

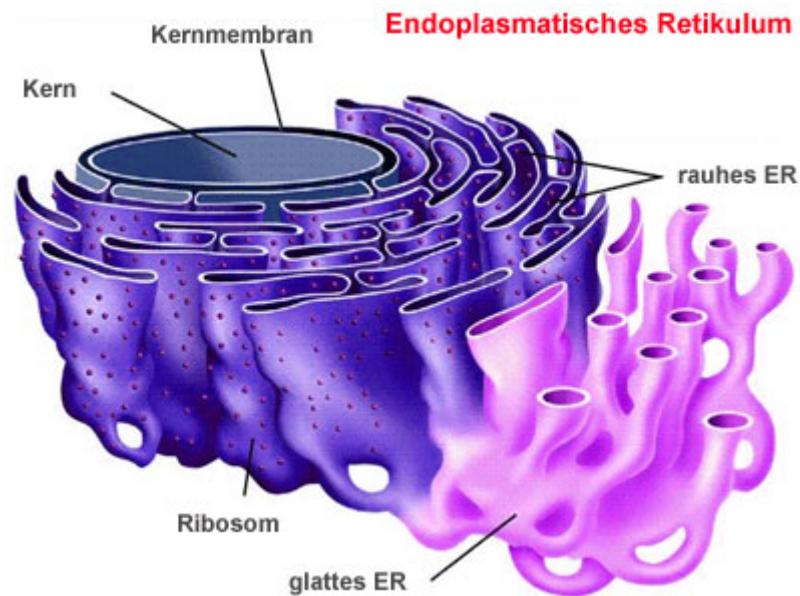


Abb. 3-14: Endoplasmatisches Retikulum.

Aus <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/bs11-53.htm>

Im Cytosol beträgt die Konzentration freier Calciumionen in Ruhe nur etwa 100 – 150 nmol/l (also etwa 10^{-7} mol/l) (Baba 2011). Im Lumen des endoplasmatischen Retikulums erreicht die Ca^{2+} -Konzentration millimolare Werte (ca. 10^{-3} mol/l). Diese Calciumionen werden aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt, wenn IP_3 -Rezeptoren auf der Membran dieser Organelle durch IP_3 stimuliert werden (Mikoshiba 2007) (Abb. 3-9). Entleerung dieser Speicher löst einen so genannten speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (store-operated calcium entry, SOCE) aus dem Extrazellulärraum aus, der das Ziel verfolgt, längerfristig die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration anzuheben und Ca^{2+} zur Wiederauffüllung des endoplasmatischen Retikulums über die SERCA-Pumpen bereit zu stellen.

1.4. Speichergesteuerter Ca^{2+} -Einstrom (SOCE)

Das Konzept des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms wurde von James W. Putney Jr. im Jahr 1986 vorgeschlagen (Putney 1986). Die experimentelle Basis für dieses Modell lieferte eine Serie von Experimenten an Parotis-Azinszellen, an denen Putney die Beziehung zwischen Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, Ca^{2+} -Einstrom und Calcium-Speicher-Wiederauffüllung untersuchte (Putney 1977; Putney et al. 1981; Poggioli, Putney 1982). Diese Experimente deuteten an, dass die Quantität von Calcium in Calcium-Speichern das Ausmaß des Calcium-Einstroms in nichterregbaren Zellen

3. Einleitung

kontrolliert. Ursprünglich wurde dieser Vorgang kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom (capacitative calcium entry) genannt, ein Begriff, der im Laufe der Zeit mehr und mehr durch den Terminus „store-operated calcium entry (SOCE)“ ersetzt wurde.

Putney wies bereits im Jahr 1986 dem Botenstoff IP_3 eine zentrale Rolle bei diesem Vorgang zu (Putney 1986). Er schreibt dort: “ Ca^{2+} -mobilization is thus seen as an initial emptying of the intracellular Ca^{2+} pool by inositol (1,4,5) trisphosphate, followed by rapid entry of Ca^{2+} into the pool and, in the continued presence of inositol (1,4,5) trisphosphate, into the cytosol. On withdrawal of agonist, inositol (1,4,5) trisphosphate is then rapidly degraded, the pathway from the pool to the cytosol is closed, and rapid entry from the outside continues until the Ca^{2+} content of the pool reaches a level that inactivates Ca^{2+} entry. This capacitative model allows for Ca^{2+} release and Ca^{2+} entry to be controlled by a single messenger, inositol (1,4,5) trisphosphate” (Abb. 3-15).

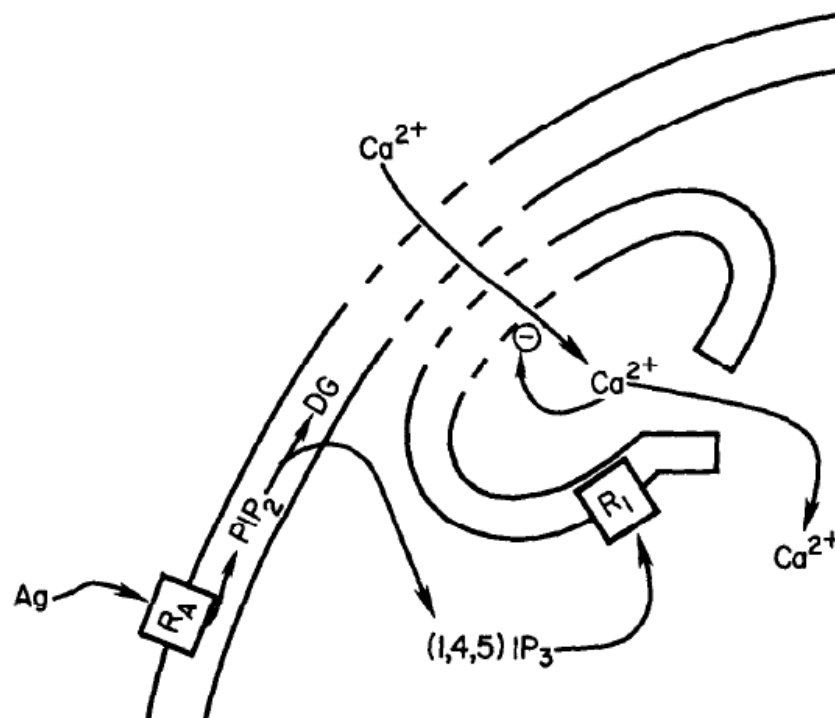


Abb. 3-15: Ursprüngliches Modell des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms von Putney in 1986.

Aus (Putney 1986)

3. Einleitung

Verschiedene Modellvorstellungen wurden im Laufe der folgenden Jahre entwickelt, wie die Kopplung zwischen Speicherentleerung und Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran erfolgen könnte (Baba, Kurosaki 2008). Dazu gehören das Ca^{2+} -Einstrom factor-(CIF)-Modell, das constitutive conformational coupling Modell, das *de novo* conformational coupling Modell und das secretion-like coupling Modell (Rosado et al. 2005) (Abb. 3-16).

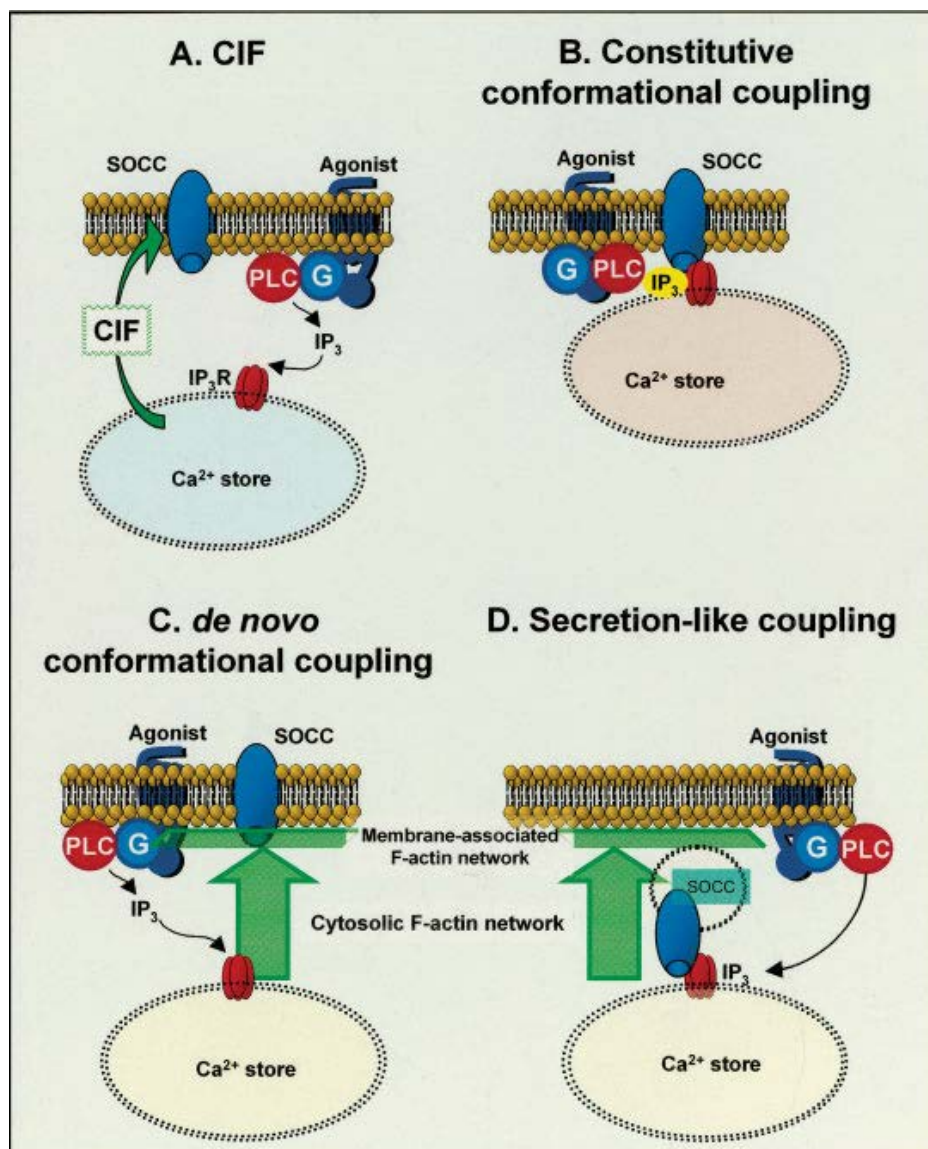


Abb. 3-16: Verschiedene Modelle über die Mechanismen des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms. Aus (Rosado et al. 2005). SOCC: store-operated Ca^{2+} channel. CIF: Ca^{2+} -Einstrom factor. PLC: Phospholipase C. G: G-protein. IP_3 : Inositol-1, 4, 5-trisphosphate. IP_3R : Inositol-1, 4, 5-trisphosphate receptor.

3. Einleitung

Der Ca^{2+} -Einstrom factor (CIF) ist als ein Botenstoff beschrieben, der bei Calcium-Speicher-Entleerung von den Speicherorganellen (Csutora et al. 1999) und/oder bei einer Abnahme der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration (Csutora et al. 2006) freigesetzt werden soll. Es sollte sich um ein kleines polares Molekül ($< 1000 \text{ D}$) (Thomas, Hanley 1995) handeln, das dann Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran aktiviert (Randriamampita, Tsien 1993) (Abb. 3-16, A).

Das constitutive conformational coupling Modell hingegen wies dem IP_3 -Weg eine zentrale Rolle zu. Es ging davon aus, dass ein Agonist zuerst an einen Rezeptor auf der Plasmamembran bindet. Folge ist die Aktivierung einer Phospholipase C vermittelt durch ein G-Protein (Jaconi et al. 1993; Berridge 1995). Die Phospholipase C lässt IP_3 entstehen (Berridge 1993), welches Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum freisetzt. Die Abnahme des Calciumgehalts innerhalb der Speicherorganellen sollte eine Konformationsänderung des IP_3 -Rezeptors auslösen. Dieser veränderte Rezeptor sollte mit einem Kationenkanal (aus der Familie der TRP-Kanäle) in Wechselwirkung treten, mit der Folge, dass sich dieser Kanal öffnet und einen Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol vermittelt. Ein Signaling-Komplex enthält in diesem Modell die Phospholipase C, einen TRP-Kanal und einen IP_3 -Rezeptor (Adebiyi et al. 2010; Trebak et al. 2003). Ca^{2+} -Speicher-Entleerung ist demnach ein entscheidendes Signal für die Kanalaktivierung in diesem Modell (Abb. 3-16, B).

In dem *de novo* conformational coupling Modell (Abb. 3-16, C) spielt das Zytoskelett eine zentrale Rolle bei der Kommunikation zwischen den Ca^{2+} -Speicherorganellen und den speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran (Rosado et al. 2005). Dieses Modell wurde verwendet, um die Kopplung zwischen IP_3 -Rezeptoren vom Typ 2 und hTRPC1-Kanälen (human canonical transient receptor potential 1) zu beschreiben (Rosado et al. 2000; Rosado, Sage 2000a, 2001). In diesem Prozess spielt das Aktin-Zytoskelett eine Doppelrolle. Zwar wird Aktin-Polymerisation für die Aktivierung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms gebraucht. Gleichzeitig fungiert das Aktin-Netzwerk aber auch als ein negativer Modulator bei der Interaktion zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und der Plasmamembran (Rosado et al. 2000; Ben-Amor et al. 2005).

Die vierte Modellvorstellung zur Beschreibung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms ist das secretion-like coupling oder vesicle fusion Modell. In diesem Modell leitet die Ca^{2+} -Speicher-Entleerung die Bindung zwischen Vesikeln, in denen die

3. Einleitung

speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanäle enthalten sind, und der Plasmamembran ein (Rosado et al. 2005) (Abb. 3-16, D). Alternativ sollen periphere Anteile des endoplasmatischen Retikulums nach der Calcium-Speicher-Entleerung zur Plasmamembran translozieren (Bakowski et al. 2001). Diese Bewegung wird von Aktin-Zytoskelett kontrolliert (Bakowski et al. 2001).

1.5. STIM und Orai

– intrazellulärer Ca^{2+} -Sensor und speichergesteuerte Kanäle

In den letzten Jahren wurden mehrere Schlüsselmoleküle, die bei der Interaktion zwischen Ca^{2+} -Speicherorganellen und Ca^{2+} -permeablen Kanälen in der Plasmamembran eine Rolle spielen, identifiziert, nämlich die Familie der STIM (stromal interacting molecule) Proteine, die als Ca^{2+} -Sensoren im endoplasmatischen Retikulum fungieren, und die Orai-Proteine, die offensichtlich den (oder Teile des) speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanals in der Plasmamembran ausmachen (Übersicht bei Taylor 2006; Hogan et al. 2010; Lee et al. 2010).

STIM wurde ursprünglich als ein Wachstumsinhibitor in Stromazellen aus dem Knochenmark beschrieben (Parker et al. 1996; Dziadek, Johnstone 2007; Rao et al. 2010). Im Jahr 2001 wurde ein Isoform des Proteins entdeckt und STIM2 genannt (Williams et al. 2001). Im Jahr 2005 wurde gezeigt, dass STIM1 beim speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom eine entscheidende Rolle spielt (Roos et al. 2005; Liou et al. 2005).

STIM ist ein Protein mit einem einfachen Membrandurchtritt, das in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Liou et al. 2005; Roos et al. 2005; Zhang et al. 2005). Sein N-Terminus befindet sich im Lumen dieser Organelle. Er enthält ein endoplasmatisches-Retikulum-Signal-Peptid, eine EF-hand-Domäne (Tufty, Kretsinger 1975) und eine SAM-Domäne. Sein C-Terminus befindet sich im Zytoplasma und setzt sich aus zwei Coiled-coil-Domänen, einer Prolin/Serin-reichen Region und einer Lysin-reichen Region zusammen (Manji et al. 2000; Williams et al. 2001; Williams et al. 2002; Stathopoulos et al. 2008) (Abb. 3-17).

3. Einleitung

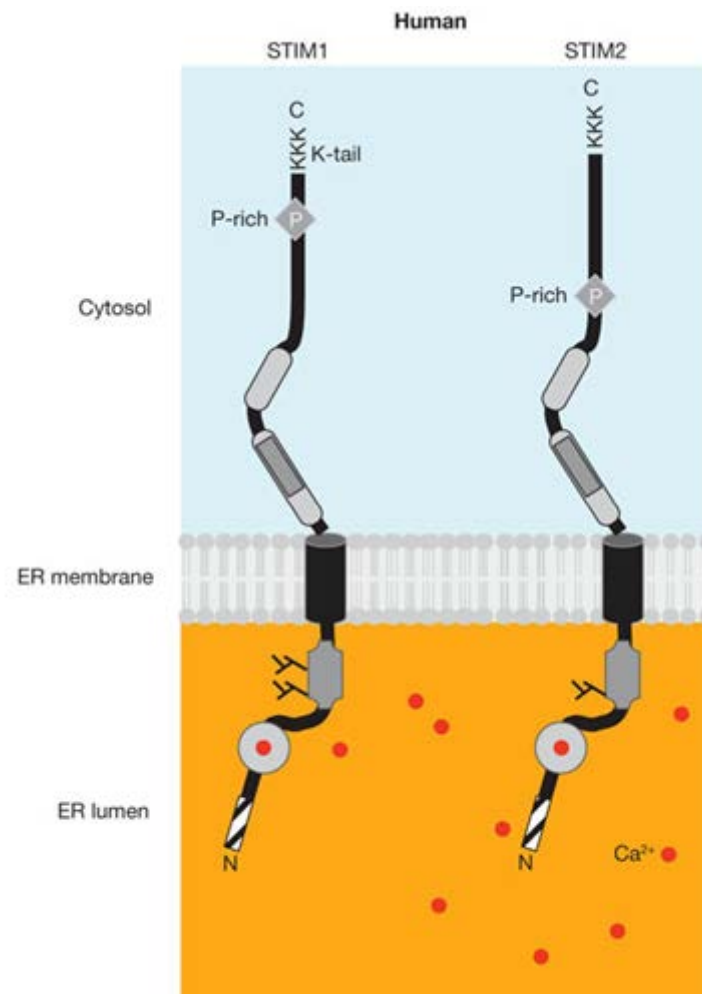


Abb. 3-17: Domänen von STIM-Proteinen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER)

Aus (Cahalan 2009)

K-tail: lysine-tail

P-rich: proline-rich

Die EF-Hand-Domäne (Abb. 3-17) registriert den Abfall des Ca^{2+} -Gehalts im endoplasmatischen Retikulum, wenn der Calcium-Spiegel in dieser Organelle auf 200 – 500 $\mu\text{mol/l}$ abfällt (Brini et al. 1999; Fahrner et al. 2009). Die EF-Hand- und die sterile- α -motif (SAM)-Domänen (EF-SAM) (Abb. 3-17) sind entscheidend zur Regulation der speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran. SAM-Domänen sind als

3. Einleitung

Protein-Protein-Interaktionsmotive bekannt. Solche SAM-Domänen findet man in mehr als 1300 Proteinen. Sie können mit anderen SAM-Domänen Dimere oder Oligomere ausbilden oder können an Nicht-SAM-enthaltende Proteine binden (Dziadek, Johnstone 2007). STIMs lagern sich in der Tat bei dem Prozess des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms zu Oligomeren zusammen (Malli et al. 2008). Die coiled-coil-Domäne (Abb. 3-17) ist ein strukturelles Motiv in Proteinen, bei dem zwei bis sieben α -Helices eine Spirale formen (Liu et al. 2006). Diese Domäne am C-Terminus von STIM ist essentiell für die Orai1-Aktivierung (Wang et al. 2009; Takahashi et al. 2007). Außerdem scheint diese Domäne auch für die Oligomerbildung von STIM notwendig zu sein (Baba 2011). Eine Lysin-reiche Region und eine Prolin/Serin-reiche Region (Abb. 3-17) existieren nur in Säugetier-STIM (Cahalan 2009). In diesen zwei Regionen kann das Protein phosphoryliert werden (Manji et al. 2000; Stathopulos, Ikura 2009).

Bei Säugtieren kennt man zwei Varianten von STIM: STIM1 und STIM2. Zwischen STIM1 und STIM2 gibt es morphologische und funktionelle Unterschiede (Abb. 3-18, A, B).

3. Einleitung

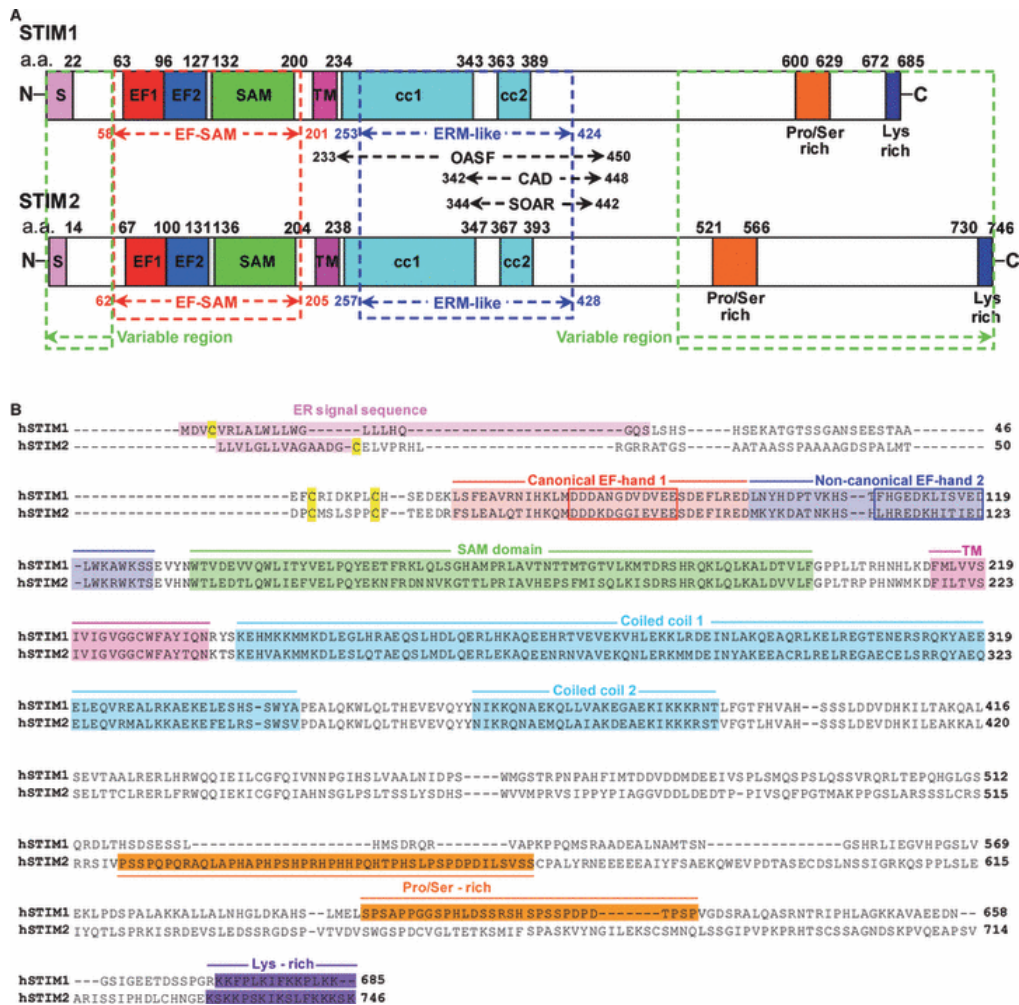


Abb. 3-18: Vergleich der Sequenzen von humanem STIM1 und STIM2.

Aus (Stathopulos, Ikura 2009)

Zwar haben beide Gene große Ähnlichkeit (> 60 % Identität, Frischauf et al. 2008; Stathopulos, Ikura 2009), aber nach der coiled-coil-Domäne und am N-Terminus gibt es größere Unterschiede. Zum Beispiel liegen zwei Asparaginreste in der SAM-Domäne bei STIM1 N-glykosyliert vor, bei STIM2 dagegen nur einer (Soboloff et al. 2006; Cai, Cookson 2007). Außerdem wird STIM1 sowohl im endoplasmatischen Retikulum als auch in der Plasmamembran gefunden, STIM2 hingegen nur im endoplasmatischen Retikulum (Soboloff et al. 2006). Auch funktionelle Unterschiede sind beschrieben. So soll beispielsweise STIM2 Orai1-Kanäle sowohl speicherabhängig als auch speicherunabhängig regulieren (Graham et al. 2011), manchmal scheint sein Beitrag zur Entwicklung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms nur gering zu sein (Oh-hora et al. 2008; Lu et al. 2009),

3. Einleitung

oder es soll basale Zytosol- und Speicher-Calcium-Konzentrationen regulieren (Brandman et al. 2007; Parvez et al. 2008). Allerdings ist in Neuronen nicht STIM1, sondern STIM2 wesentlich für den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (Berna-Erro et al. 2009).

Der Arbeitspartner von STIM-Proteinen in der Plasmamembran ist Orai, das auch CRACM (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channel modulator) genannt wird. Orai ist ein Teil des speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanals (Yeromin et al. 2006; Prakriya et al. 2006), genauer gesagt die porenbildende Untereinheit dieses Kanals (Muik et al. 2012).

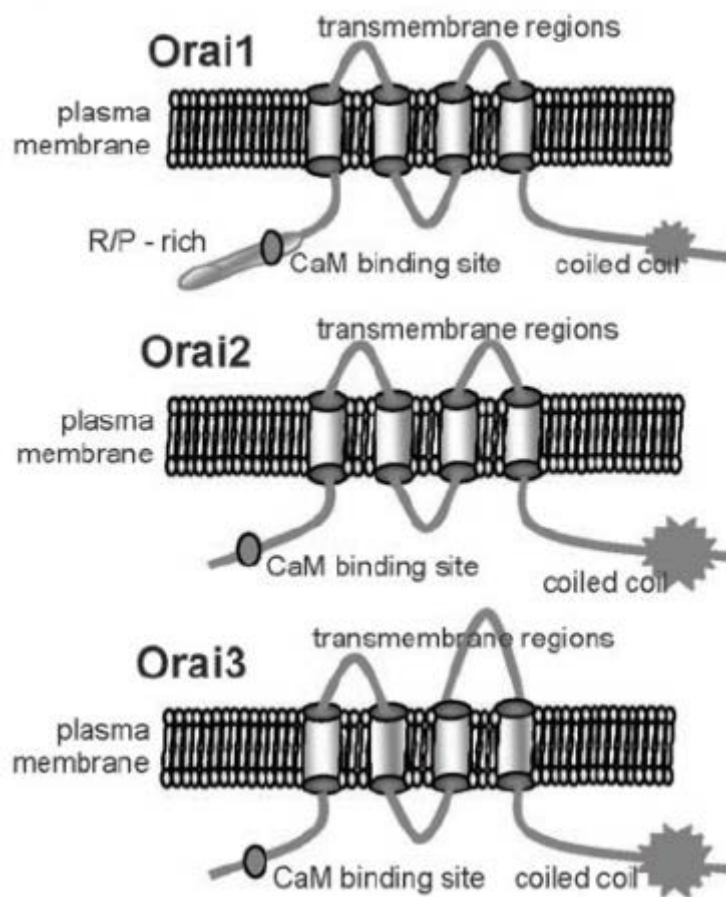


Abb. 3-19: Struktur von drei verschiedenen Orai-Proteinen.

Aus (Frischauf et al. 2008)

R/P-rich: arginine/proline-rich.

3. Einleitung

Alle drei bekannten Orai-Proteine (Orai1, Orai2 und Orai3) enthalten vier transmembranäre Segmente (Frischauf et al. 2008) (Abb. 3-19). Der N-Terminus von Orai liegt im Zytosol, lediglich im Falle von Orai1 enthält er eine Prolin/Arginin-reiche Region (Cahalan et al. 2007) (Abb. 3-19). Diese Region vermittelt die Reaktivität des so genannten Gates, also des porenöffnenden bzw. porenverschließenden Kanalteils (Frischauf et al. 2011). Die Geschwindigkeit dieses Prozesses wird von der zweiten intrazellulären Schleife des Proteins kontrolliert (Frischauf et al. 2011) (Abb. 3-18, 21). An ihrem C-Terminus enthalten alle drei Orai-Proteine eine mutmaßliche coiled-coil-Domäne (Abb. 3-19). Die extrazelluläre Schleife von Orai1 zwischen dem dritten und dem vierten Transmembransegment umfasst eine N-Glykosylierungsstelle (Cahalan et al. 2007; Prakriya et al. 2006). Dieser scheint aber keine wesentliche Rolle für die Funktion des Proteins zuzukommen (Gwack et al. 2007). Außerdem bildet Orai3 eine deutlich längere zweite extrazelluläre Schleife als Orai1 und Orai2 aus (Frischauf et al. 2008).

Alle Orai-Proteine können entweder als Homomer (Vig et al. 2006; Li et al. 2007) (Abb. 3-20, 3-22) oder als Heteromer (Zhang et al. 2008) (Abb. 3-22) vorkommen. Diese Homomere oder Heteromere funktionieren als Kanalpore von Ca^{2+} -Kanälen (Shuttleworth 2009). Vier Orai1-Untereinheiten bilden zusammen so genannte CRAC (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channels)-Kanäle (Mignen et al. 2008), während ein Oligomer aus drei Orai1- und zwei Orai3-Untereinheiten ARC- (arachidonate-regulated Ca^{2+})-Kanäle (Mignen et al. 2009) entstehen lässt (Abb. 3-22).

3. Einleitung

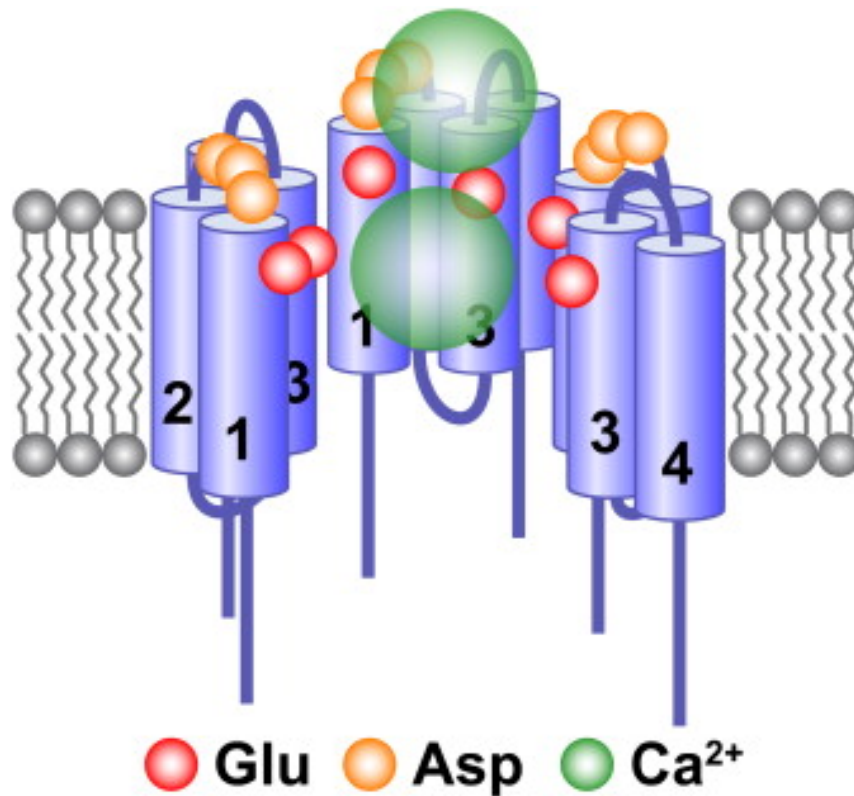


Abb. 3-20: Homomer von Orai1.

Aus (Vig et al. 2006)

Der Glutamatrest E106 in der ersten transmembranären Domäne und E190 in der dritten transmembranären Domäne (Abb. 3-21) tragen zur Ionenselektivität des Kanals bei. Beide sind zur Innenseite der Porenregion orientiert. Ein Aspartatrest soll als hoch affine Ca²⁺-Bindungsstelle wirken. Sie unterstützt die Passage der Calciumionen durch den Kanal.

3. Einleitung

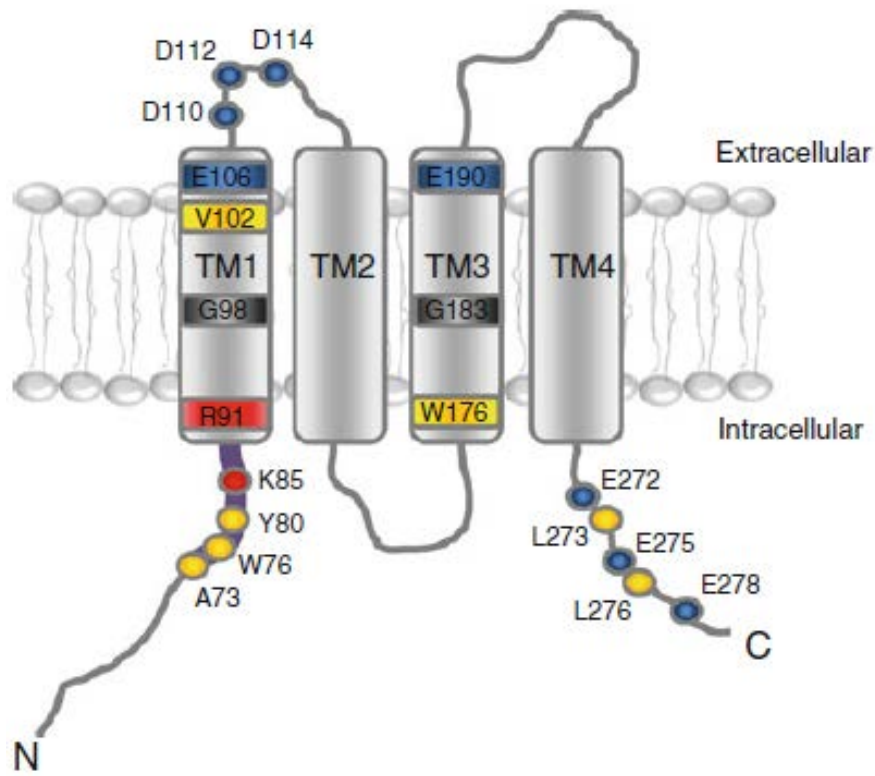


Abb. 3-21: Struktur von Orai1.

Aus (Muik et al. 2012)

Die konservierte Region (violette Linie in Abb. 3-21) nahe dem N-Terminus enthält wichtige Aminosäuren für das Gate des Kanals (K85, R91) und die calciumabhängige Bindung von Calmodulin (A73, W76, Y80). Die erste transmembranäre Domäne enthält die porenbildenden Anteile und den Selektivitätsfilter des Kanals. Die dritte transmembranäre Domäne soll einen allosterischen Effekt auf das Gate besitzen. Der C-Terminus umfasst geladene (E272, E275, E278) und hydrophobe (L273, L276) Aminosäuren, die wahrscheinlich Coiled-coil-Domänen bilden und die Kopplung an STIM ermöglichen.

3. Einleitung

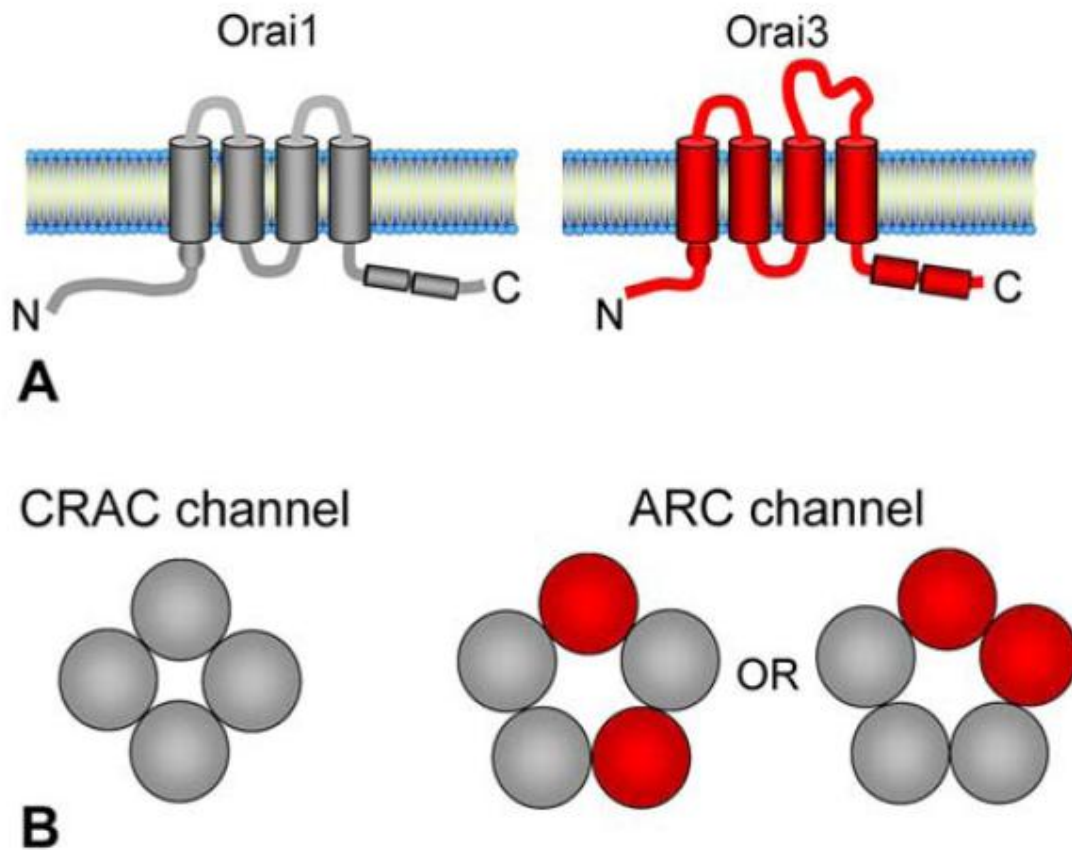


Abb. 3-22: CRAC-Kanal und ARC-Kanal.

Aus (Shuttleworth 2012)

A. Basale Struktur von Orai1 und Orai3. Beide haben vier Transmembrandomänen mit intrazellulären N- und C-Termini. Orai3 besitzt eine verlängerte extrazelluläre Schleife zwischen der dritten und vierten transmembranären Domäne.

B. Unterschiede zwischen CRAC-Kanal (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channel) und ARC-Kanal (arachidonate-regulated Ca^{2+} channel). Links: Der CRAC-Kanal ist ein Homotetramer aus Orai1 (grau) (Vig et al. 2006; Mignen et al. 2008; Ji et al. 2008; Penna et al. 2008; Maruyama et al. 2009). Rechts: der ARC-Kanal wird von einer pentamerischen Anordnung von drei Orai1 (grau) und zwei Orai3 (rot) (Park et al. 2009) gebildet. Es gibt zwei strukturelle Möglichkeiten für ARC-Kanäle (Park et al. 2009).

3. Einleitung

Im Falle der CRAC-Kanäle, einer besonderen Form von speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanälen, formen vier Orai1-Untereinheiten ein Tetramer, wenn die CRAC-Kanäle durch STIM aktiviert werden. Andernfalls liegen sie als Dimer vor (Penna et al. 2008). Der CRAC-Kanal ist ein hochselektiver Ca^{2+} -Kanal in T-Lymphozyten, Mastzellen und verschiedenen anderen Zellen. Er reguliert zelluläre Prozesse wie Genexpression, Motilität und Sekretion von Entzündungsmediatoren (Prakriya 2009). Der ARC-Kanal hingegen ist zwar auch ein hochselektiver Ca^{2+} -Kanal, er besitzt aber eine geringe Einzelkanalleitfähigkeit. Er wird schon in geringen Konzentrationen durch intrazelluläre Arachidonsäure aktiviert (Shuttleworth 2012). Diese Kanäle werden in verschiedene Zellen exprimiert (Mignen, Shuttleworth 2001; Mignen et al. 2005).

Die Struktur von ARC- und CRAC-Kanälen ist zwar ähnlich, aber ihre Funktion unterscheidet sich deutlich. Die Öffnung von CRAC-Kanälen ist immer eine Reaktion auf eine Ca^{2+} -Speicher-Entleerung (McNally, Prakriya 2012) genauer wenn die Calcium-Konzentrationen in endoplasmatischen Retikulum auf unter 35 – 40 % des Normalbereichs fällt (Luik et al. 2008). Dabei wird Ca^{2+} aus der EF-Hand-Domäne des STIM1s freigesetzt. Dies leitet die Oligomerisation von STIM1 ein (Stathopulos et al. 2006; Stathopulos et al. 2008) (Abb. 3-23). Dann folgt die Bewegung von STIM1 in die Nähe der Plasmamembran. Die dort entstehenden Komplexe aus endoplasmatischen Retikulum und Plasmamembran formen so genannte Puncta (Liou et al. 2005; Wu et al. 2006) (Abb. 3-23). STIM1 wirkt in den Puncta mit Orai zusammen. STIM1 leitet dabei die Zusammenlagerung von Orai-Untereinheiten ein, so dass aktive speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle entstehen (Yeromin et al. 2006; Vig et al. 2006; Walsh et al. 2010) (Abb. 3-23).

3. Einleitung

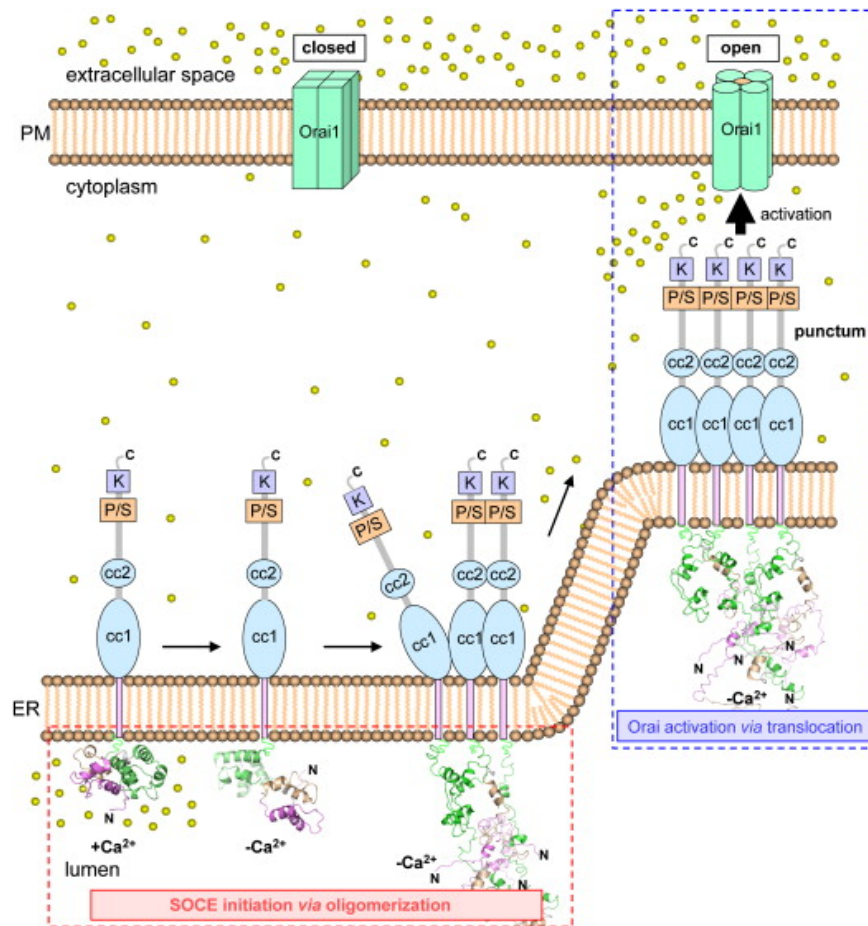


Abb. 3-23: Ein Modell eines speicher-gesteuerten Ca^{2+} -Kanals auf der Basis des CRAC-Kanals.

Aus (Stathopoulos et al. 2008)

N: N-Terminus

CC1: coiled-coil domain 1

CC2: coiled-coil domain 2

P/S: proline/serine-rich domain

K: lysine-tail

C: C-Terminus

ARC-Kanäle hingegen stellen den Hauptweg des Calciumeinstroms in Zellen während Oszillationen des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels dar; sie werden vor allem bei niedrigen Agonist-Konzentration aktiviert (Shuttleworth 2012). STIM1 als Calcium-Sensor des endoplasmatischen Retikulums beeinflusst aber auch diesen Kanal. Dies kann entweder dadurch erfolgen, dass STIM1 selbst durch Arachidonsäure aktiviert wird (Abb. 3-24, A)

3. Einleitung

oder nach Rezeptoraktivierung kommt es zur simultanen Bildung von IP_3 und Arachidonsäure, die dann auf den ARC-Kanal einwirkt (Abb. 3-24, B). Nur STIM1 in der Plasmamembran kann dabei mit dem Kanal interagieren (Mignen et al. 2001, 2007).

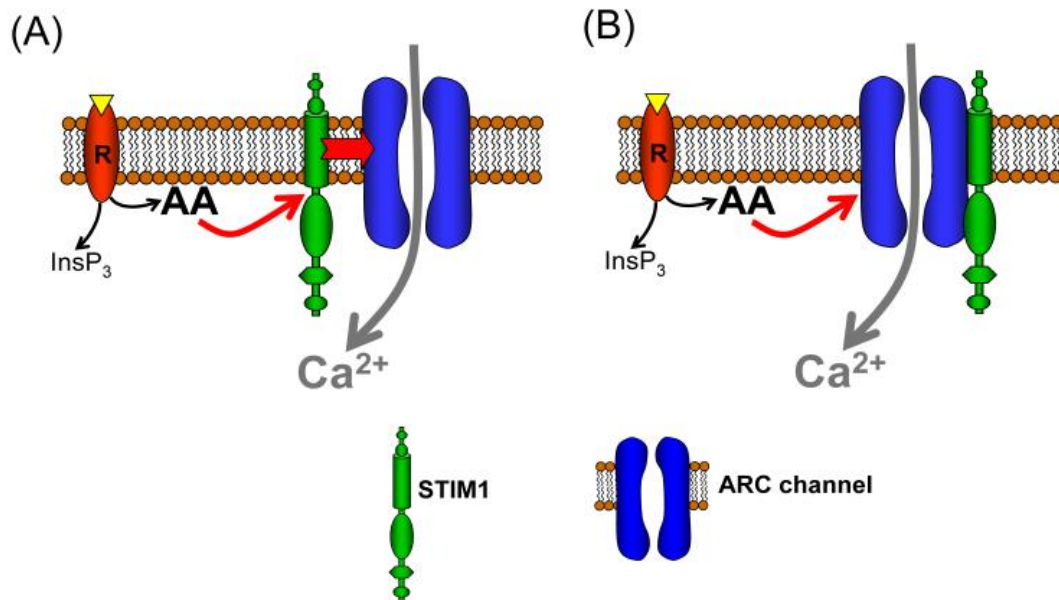


Abb. 3-24: Mögliche Mechanismen für die Regulation von ARC-Kanälen durch STIM1.

Aus (Shuttleworth et al. 2007)

4. Fragestellung

Die meisten bisherigen Untersuchungen zur Klärung der Rolle von STIM1 beim Ca^{2+} -Signaling wurden an nichtpolarisierten Zellen wie etwa Lymphozyten (siehe z.B. Wu et al. 2006; Barr et al. 2008) oder nichtkonfluenten HEK293-Zellen (siehe Smyth et al. 2007; Mercer et al. 2006; Wedel et al. 2007) durchgeführt. Nur sehr wenige Studien befassten sich mit STIM1/Orai-Signalwegen an polarisierten Epithelien wie etwa der humanen Kolonkarzinomzelllinie NCM460, wo STIM1 auch an der Stimulation der cAMP-Bildung nach Ca^{2+} -Speicherentleerung beteiligt ist (Roy et al. 2010), von IEC-6 Zellen (eine Kryptenzelllinie von der Ratte), wo STIM1 zur Heilung von Epitheldefekten beiträgt (Rao et al. 2010), oder Pankreasacinuszellen (Petersen, Tepikin 2008; Kim et al. 2009). Da nicht bekannt ist, ob – und wenn ja, wo – native, polarisierte Epithelzellen STIM- und Orai-Proteine exprimieren, sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Werden STIM1 und Orai1 vom Kolonepithel der Ratte exprimiert? Kommen dort auch andere STIM- (STIM2) und Orai-Isoformen (Orai2 und Orai3) vor?
2. Wo sind STIM1 und Orai1 in Kolonepithelzellen lokalisiert?
3. Ändert sich die Lokalisation von STIM1 nach Calcium-Speicherentleerung? Wenn ja, welche Mechanismen sind daran beteiligt?
4. Welche Rolle spielen STIM/Orai-vermittelte Ca^{2+} -Einstromwege in der apikalen bzw. der basolateralen Membran solcher polarisierten Epithelien?
5. Wie ändern sich Ca^{2+} -Signale nach Downregulation von STIM1?

5. Material

5.1. Versuchstiere

Für die Versuche im Rahmen dieses Projekts wurden Wistar-Ratten aus eigener Zucht des Instituts für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet. Die Tiere wurden bis vor dem jeweiligen Versuch nach Geschlechtern getrennt in Kleingruppen im Versuchstierstall des Instituts gehalten. Die Haltung erfolgte in einem ganzjährig klimatisierten Raum bei 22,5 °C Raumtemperatur, 50 – 55 % relativer Luftfeuchtigkeit und 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Ratten hatten während der gesamten Zeit Zugang zu Standard-Zucht-Futter und Wasser ad libitum.

Die Ussingammer- und immunhistochemischen Versuche wurden mit männlichen und weiblichen Ratten mit einem Körpergewicht von 200 bis 250 g durchgeführt (Schultheiss 2002).

5.2. Kolontumorepithelzelllinie

Für die Versuche im Rahmen dieses Projekts wurde die HT29/B26 (human colon adenocarcinoma grade II, clone B6) Zelllinie benutzt (freundliche Gabe von Prof. Dr. M. Fromm, Charité Berlin) (Bojarski et al. 2001). Die Zellen wurden bis vor dem jeweiligen Versuch in einem Brutschrank (Selutec Teco 10, MS-Laborgeräte, Dielheim, Deutschland) bei 37 °C in 5 % Kohlendioxid/95 % Luft (Vol/Vol) gelagert. Diese Zellen wurden 1964 aus einem Kolonkarzinom von einer 44-jährigen Frau isoliert und etabliert (Chen et al. 1987).

5.3. Geräte

- Kryostat Leica CM 3050S (Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop Eclipse 80i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland)
- Konfokales Mikroskop Leica TCS SL (Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland)
- Computergesteuerte Voltage-Clamp-Anlage (Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen, Deutschland)
- Brutschrank Selutec Teco 10 (MS-Laborgeräte, Dielheim, Deutschland)
- Tiefkühltruhe Heraeus HERA freeze (Kendro Laboratory products, Hanau, Deutschland)
- Heizplatte MR3003 SD (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland)

5. Material

- Lichtmikroskop IX 50 (Olympus Optical, Tokyo, Japan)
- CCD (charge coupled device)-Kamera (Till Photonics, Martinsried, Deutschland)
- Rollerpumpe 11OSC.G18.CH5B (Ole Dich Instrumentsmakres, Hvidovre, Dänemark)
- Lamina flow LaminAir LB-48-C (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Waage ZF-20-386 (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)

5.4. Lösungen

5.4.1. Gelatine-Lösungen

Zur Beschichtung der Objektträger wurde 5 g/l Gelatine (300 bloom; die Einheit bloom ist ein Indikator für die Festigkeit der erkalteten Form der Gelatine) in Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde unter ständigem Rühren auf 54°C erhitzt (MR3003 SD, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) und 0,05 g/l Chromkaliumsulfat hinzugefügt. Für die Gewebeeinbettung wurden 100 g/l Speisegelatine in Aqua dest. unter Rühren gelöst und nach 10 min Quellen unter ständigem Rühren auf 37 °C erwärmt. Die fertige Lösung wurde vor Gebrauch filtriert.

5.4.2. Phosphatpuffer

Für die immunhistochemischen Experimente wurde ein 100 mmol/l Phosphatpuffer, der folgende Substanzen enthielt, verwendet (Tabelle 5-1).

Für 5 l Aqua dest.

Substanz	Quantität (g)	Konzentration (mmol/l)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13,8	20
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	143,3	80

Tabelle 5-1: Zusammensetzung des Phosphatpuffers

Der pH-Wert wurde mit NaOH und HCl ohne Begasung auf 7,4 eingestellt.

5. Material

5.4.3. Phosphate-buffered saline (PBS)

Für die immunhistochemischen Experimente an HT29/B6-Zellen wurde eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) verwendet. Eine Tablette phosphate-buffered saline (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) wurde in 200 ml Aqua bidest. gelöst. Die Lösung enthielt folgende Substanzen (Tabelle 5-2).

Für 1 l Aqua bidest.

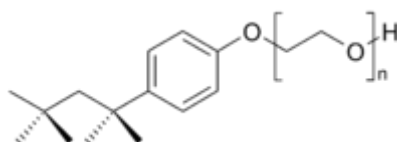
Substanz	Quantität (g)	Konzentration (mmol/l)
KH_2PO_4	0,2	4,8
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,90	7,2
KCl	0,2	2,7
NaCl	8	137

Tabelle 5-2: Zusammensetzung der Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS)

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Diese Lösung ist im Kühlschrank lang haltbar.

5.4.4. PBS-T (PBS mit Triton X-100)

Triton X-100 ist ein nichtionisches Tensid, das eine hydrophile Polyethylenoxid-Gruppe und eine lipophile Hydrocarbon-Gruppe trägt (Abb. 5-1). Es wird verwendet, um die Permeabilität von Zellen zu erhöhen. Für die Herstellung von PBS-T wurde 0,5 ml Triton X-100 in 1 l PBS gelöst.



Triton X-100

Abb. 5-1: Strukturformel von Triton X-100

5. Material

5.4.5. Paraformaldehyd-Lösung (PFA, 4 %)

Um das Kolongewebe der Ratte zu fixieren, wurde eine 40 g/l Paraformaldehyd-Lösung hergestellt. Alle Arbeitsschritte hierfür wurden unter dem Abzug durchgeführt. Es wurden 4 g Paraformaldehyd (PFA) in 100 ml Phosphatbuffer unter ständigem Rühren bei 55 °C gelöst. Nachdem die Lösung aufgeklart war, wurde sie filtriert, um eventuelle Rückstände zu entfernen. Die Fixationslösung wurde lichtgeschützt bei +4°C aufbewahrt und konnte so 2 Wochen lang verwendet werden. Auch die HT29/B6-Zellen wurden mittels 4% (Gew/Vol) Paraformaldehyd fixiert, allerdings wurde das Fixans dafür in PBS gelöst.

5.4.6. Blocking-Lösung

Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen an den Gewebeschnitten wurde eine Blocking-Lösung hergestellt. Diese enthielt folgende Substanzen (Tabelle 5-3).

Für 1 l Phosphatpuffer

Substanz	Quantität
Triton X-100	2 ml
BSA (bovines Serumalbumin)	30 g
NGS (normal goat serum)	100 ml

Tabelle 5-3: Zusammensetzung der Blocking-Lösung

Für die Versuche mit den HT29/B6-Zellen wurde als Blocking-Lösung 10 ml NGS (Ziegenserum) mit 90 ml PBS-T vermischt.

5. Material

5.4.7. Parsons-Lösung

Für die Inkubation der Gewebe während der Ca^{2+} -Speicher-Entleerung wurde für die Kontrollgewebe eine Lösung (Parsons, Paterson 1965) mit folgender Zusammensetzung verwendet (Tabelle 5-4).

Für 1 l Aqua dest.

Substanz	Quantität	Konzentration (mmol/l)
NaCl	6,253 g	107
NaHCO_3	2,100 g	25
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,645 g	1,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,028 g	0,2
KCl	0,336 g	4,5
Glukose	2,198 g	12,2
CaCl_2	1 ml aus einem 1,25 M CaCl_2 -Stamm	1,25
MgSO_4	1 ml aus einem 1,25 M MgSO_4 -Stamm	1,0

Tabelle 5-4: Zusammensetzung der Parsons-Lösung

Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH und HCl unter Begasung mit Carbogen (5 % Kohlendioxid, 95 % Sauerstoff; Vol/Vol) auf 7,4 eingestellt. Mit diesem Gasgemisch wurde die Pufferlösung dann auch kontinuierlich während der Versuche begast. Zur Inkubation der Gewebe, bei denen eine Ca^{2+} -Speicher-Entleerung induziert werden sollte, wurde das CaCl_2 in dieser Lösung weggelassen.

5.4.8. Tyrode-Lösung

Für die Ussingkammer-Versuche und die Imaging-Experimente wurde eine bicarbonatfreie mit HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure) gepufferte Tyrode-Lösung verwendet. Die Lösung enthielt folgende Substanzen (Tabelle 5-5).

5. Material

Für 1l Aqua dest.

Substanz	Quantität	Konzentration (mmol/l)
NaCl	8,182 g	140
HEPES	2,383 g	10
Glukose	2,169 g	12,2
KCl	0,403 g	5,4
CaCl ₂	1 ml aus dem 1,25 M CaCl ₂ -Stamm	1,25
MgCl ₂	1 ml aus dem 1 M MgCl ₂ -Stamm	1

Tabelle 5-5: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung

Diese Lösung wurde mit NaOH/HCl ohne Begasung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Für die Ca²⁺-Speicher-Entleerung wurde eine modifizierte Tyrode-Lösung genutzt, bei der kein CaCl₂ zugegeben wurde.

5.4.9. Zellkulturmedien

- Ready mix RPMI mit Penicillin-Streptomycin

Für die Zellkultur der HT29/B6-Zellen wurde RPMI 1640 Ready Mix mit 10 % FBS Gold und L-Glutamin (PAA, Cölbe, Deutschland) verwendet. Um eine bakterielle Besiedlung zu vermeiden, wurde 1 % (Vol/Vol) einer Antibiotika-Stammlösung aus Penicillin (10,000 E) und Streptomycin (10,000 µg/ml) (PAA, Cölbe, Deutschland) dem Medium zugesetzt.

- Hank's BSS

Um Zellen zu waschen, wurde Hank's BBS (balanced salt solution; PAA, Cölbe, Deutschland) verwendet (Hanks, Wallace 1949). Diese Lösung enthielt folgende Substanzen (Tabelle 5-6).

5. Material

Für 1 l Aqua dest.

Substanz	Quantität (g)	Konzentration (mmol/l)
NaCl	8	137
KCl	0,4	5,4
CaCl ₂	0,14	1,26
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,81
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,06	0,33
KH ₂ PO ₄	0,06	0,44
Glukose	1	5,6
NaHCO ₃	0,35	4,17

Tabelle 5-6: Zusammensetzung der Hank's BSS -Lösung

- Hank's BSS ohne Calcium/Magnesium

Zum Passagieren der Zellen wurde eine Hank's BSS ohne Calcium und Magnesium (PAA, Cölbe, Deutschland) verwendet. Diese Lösung enthielt weder CaCl₂ noch MgSO₄·7H₂O, sonst weist sie keinen Unterschied zu Hank's BSS mit Calcium/Magnesium auf. Durch den Ca²⁺-Entzug wird die Adhäsion der Zellen am Substrat durch Cadherine, das ist eine Familie von Glykoproteinen, die als Adhäsionsmoleküle fungieren (Takeichi 1988), gelöst.

- Trypsin/EDTA

Eine Trypsin-Lösung (Trypsin 0,05 % (Gew/Vol) - EDTA 0,02 % (Gew/Vol) gelöst in PBS; PAA, Cölbe, Deutschland) wurde verwendet, um die Verbindung zwischen den Zellen beim Passagieren zu lösen. Für diesen Zweck wurden die Zellen für 5 min in dieser Lösung inkubiert. Die Trypsin-Lösung wurde in 25 ml aliquotiert, und bei -15°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

5. Material

5.4.10. Medien für die Transfektionsexperimente

-5× siRNA Buffer

5× siRNA Buffer (Thermo Scientific Dharmacon, Lafayette, CO, USA) wurde vor dem jeweiligen Experiment in Aqua bidest. 5-fach verdünnt und aliquotiert. Dieser Puffer wurde verwendet, um siRNA zu lösen. Dieser Puffer enthielt folgende Substanzen (Tabelle 5-7).

Für 100 ml Aqua bidest.

Substanz	Quantität	Konzentration (mmol/l)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2,24 g	1,0
HEPES-freie Säure	0,72 g	30
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,02 g	0,81
KCl	2,24 g	300
KOH	0,24 g	40

Tabelle 5-7: Zusammensetzung des 5×-konzentriertes siRNA Buffers.

Der Puffer wurde bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt und musste innerhalb von 3 Monaten verwendet werden.

- Opti-MEM

Opti-MEM reduced-serum Medium (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) ist ein so genanntes minimal essential medium (MEM), welches, ohne die Zellwachstumsrate oder die Morphologie der Zellen zu verändern, mit einer bis zu 50 % reduzierten Konzentration an fetalem Kälberserum auskommt. Dieses Medium eignet sich gut zur Lösung von kationischen Lipid-Transfektionsreagentien wie Lipofectamin, welches von mir für die Transfektion der HT29/B6-Zellen mit siRNA verwendet wurde.

- Lipofectamin-Lösung

Lipofectamin (Invitrogen, Leiden, Niederlande) wurde für die Transfektion HT29/B6-Zellen verwendet. 12 µl Lipofectamin wurde erst in 188 µl Opti-MEM gelöst, dann wurde 100 µl dieser Lipofectamin-Opti-MEM-Lösung zu 100 µl siRNA-Lösung

5. Material

gegeben. Je 50 µl dieser Lösung wurde in Zellkulturschalen mit den HT29/B6-Zellen gegeben.

5.5. Antikörper

5.5.1. Primärantikörper

Der jeweils verwendete primäre Antikörper wurde in entsprechender Konzentration einer Lösung zugesetzt. Die Antikörper und die Substanzen stehen unten aufgeführt (Tabelle 5-8).

Primärantikörper

Primärantikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Monoklonaler STIM1 Antikörper	Maus	1 : 500	Acris, Herford, Deutschland
Polyklonaler STIM2 Antikörper	Kaninchen	1 : 1000	Novus Biologicals, Littleton, USA
Polyklonaler Orai1 Antikörper	Kaninchen	1 : 500	ProSci, Poway, USA
Polyklonaler Orai2 Antikörper	Kaninchen	1 : 200	ProSci, Poway, USA
Polyklonaler Orai3 Antikörper	Kaninchen	1 : 100	ProSci, Poway, USA

Tabelle 5-8: Verwendete Primärantikörper

5. Material

5.5.2. Sekundärantikörper

Der jeweils verwendete sekundäre Antikörper wurde in entsprechender Konzentration einer Lösung zugesetzt. Die Antikörper und die Substanzen stehen unten aufgeführt (Tabelle 5-9).

Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Zielstruktur	Darstellung	Verdünnung	Hersteller
Cy3 donkey anti mouse	Primär- antikörper aus der Maus	Rot	1 : 500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy3 donkey anti rabbit	Primär- antikörper aus dem Kaninchen	Rot	1 : 800	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy3 goat anti mouse	Primär- antikörper aus der Maus	Rot	1 : 500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alexa Fluor®488 goat anti mouse	Primär- antikörper aus der Maus	Grün	1 : 500	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

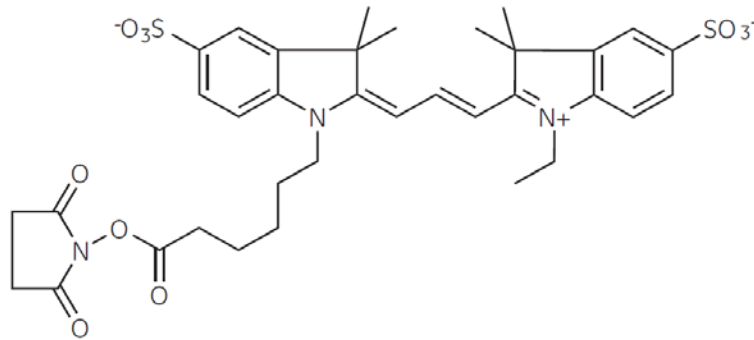
Tabelle 5-9: Verwendete Sekundärantikörper

5.6. Farbstoffe

5.6.1. Cy3-Lösung

Carbocyanin (Cy)-konjugierte Immunoreagenzien leuchten hell und sind stabil, deshalb werden sie häufig zur Immunfluoreszenzmarkierung benutzt (Wessendorf, Brelje 1992) (Abb.5-2).

5. Material

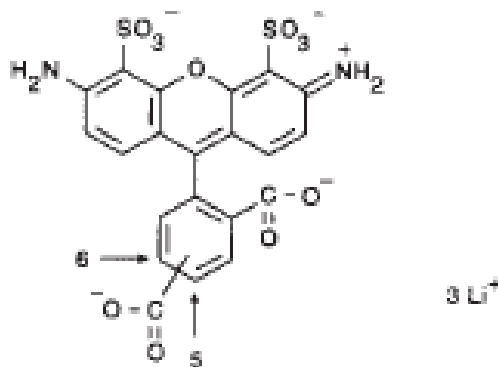


Aus <http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/07-041-01.pdf>

Abb.5-2: Strukturformel des Cy3

5.6.2. Alexa Fluor®488

Bei den Alexa-Fluoreszenzreagenzien (Panchuk-Voloshina et al. 1999) handelt es sich um sulfonierte Verbindungen (Abb.5-3), die nach der Wellenlänge benannt werden, bei der sie die stärkste Lichtemission zeigen. Von mir eingesetzt wurde Alexa Fluor®488, das bei entsprechender Anregung grün fluoresziert.



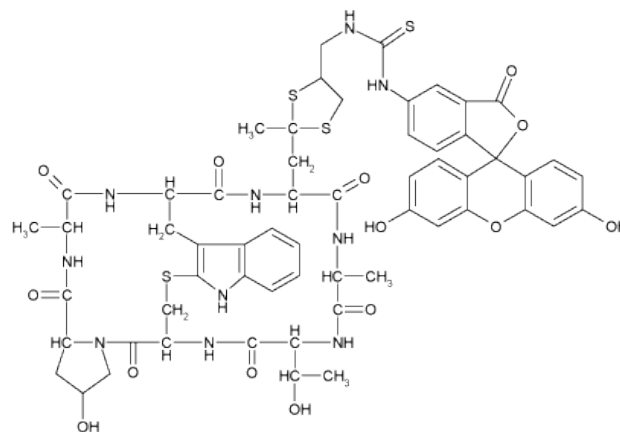
Alexa Fluor®488

Abb.5-3: Strukturformel des Alexa Fluor®488

5. Material

5.6.3. Phalloidin-FITC

Phalloidin als Hauptvertreter der Phallotoxine ist eines der Toxine des grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides* (Lynen, Wieland 1938). Phalloidin bindet selektiv an F-Aktin (Cooper 1987) (Wieland 1987). Aus diesem Grund kann Fluoreszenzstoff-konjugiertes Phalloidin (Abb. 5-4) für die Visualisierung von Aktin-enthaltenden Strukturen verwendet werden (Wulf et al. 1979). FITC (Fluorescein isothiocyanate) ist ein Derivat des Fluoreszeins. Die Emission des FITCs findet im Bereich von 465 nm bis 573 nm statt (Faultisch et al. 1988).



Phalloidin-FITC

Abb. 5-4: Strukturformel von Phalloidin-FITC

Zur Darstellung von Aktinfilamenten am Kolonepithel wurde folgende Phalloidin-FITC-Lösung hergestellt (Tabelle 5-10).

Für 1 l Phosphatpuffer

Substanz	Quantität
Phalloidin-FITC	2 mg
Triton X-100	1 ml
Milchpulver	5 g
BSA	10 g
NGS	1 ml

Tabelle 5-10: Substanzen in der Phalloidin-FITC-Lösung

Diese Färbelösung wurde verwendet, um bei der Herstellung der Gefrierschnitte den vollständigen Längsanschnitt der Krypten überprüfen zu können. Sie enthielt folgende Substanzen (Tabelle 5-11).

Substanz	Quantität
Kresylviolettacetat	1 g
Eisessig	2,5 ml

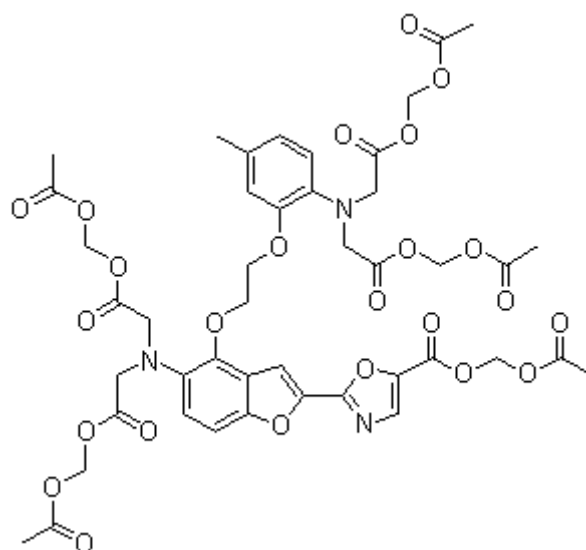
Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol Dilactat) verwendet (Abb. 5-5). Aus einer wässrigen Stammlösung (10,9 mmol/l) wurde durch Verdünnung mit Phosphatpuffer eine Gebrauchslösung (Endkonzentration 300 nmol/l) hergestellt. Die Gebrauchslösung wurde bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt und war bei sachgerechter Lagerung etwa ein halbes Jahr verwendbar. Diese Substanz färbt Kerne unabhängig von der Zellart an (Kubista et al. 1987).



5. Material

5.6.6. Fura-2 AM-Lösung

1 mg Fura-2 Acetmethoxyester (Fura-2 AM, Invitrogen, Leiden, Niederlande; Abb. 5-6) wurde in 1 ml DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Für den jeweiligen Versuch wurde täglich eine frische Lösung zum Aufladen des HT29/B6-Zellen hergestellt (Steidle, Diener 2011). Diese basierte auf der Tyrode-Lösung, der 6 µmol/l Fura-2 AM und 0,5 g/l Pluronic acid (Invitrogen, Leiden, Niederlande) zugesetzt waren. Pluronic acid ist ein nichtionisches Tensid, das die Aufnahme von Fura-2 in Zellen verbessert (Moghimi, Hunter 2000).



Fura-2 AM

Abb. 5-6: Strukturformel von Fura-2 AM

5.7. Chemikalien

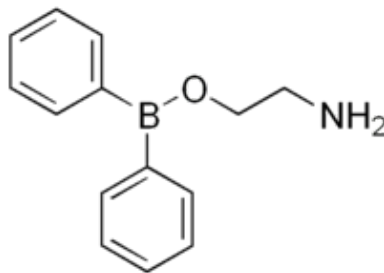
Forskolin (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) wurde in Ethanol gelöst (maximale Ethanolkonzentration 0,3 ml/l). 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB), Brefeldin, Cyclopiazonsäure, (Alexis, Grünberg, Deutschland), Phalloidin-FITC und Thapsigargin (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) wurden in Dimethylsulphoxid (DMSO; maximale DMSO-Konzentration 2,0 ml/l) gelöst. Jasplakinolide (Invitrogen, Leiden, Niederlande) wurde in Methanol (Endkonzentration 2,0 ml/l) gelöst. Calciumchlorid, Carbachol, Colchicin, Lanthanchlorid und Rutheniumrot wurden in wässrigen Stammlösungen angesetzt. Sofern nicht anders angegeben, stammten die Substanzen von Sigma (Taufkirchen,

5. Material

Deutschland).

5.7.1. 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB)

Um IP_3 -Rezeptoren zu blockieren (Maruyama et al. 1997) wurde 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) eingesetzt (Abb. 5-7). 7,8 mg 2-APB wurden zuerst in 1 ml DMSO gelöst. Dann wurde 28,6 μl 2-APB-DMSO-Lösung in 100 ml Tyrode-Lösung gelöst (Endkonzentration: 10^{-5} mol/l).

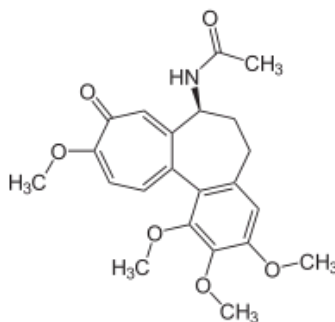


2-APB

Abb. 5-7: Strukturformel des 2-APB

5.7.2. Colchicin

Um die Funktion von Tubulin zu unterbinden (Borisy, Taylor 1967), wurde Colchicin eingesetzt (Abb. 5-8). Colchicin bindet Tubulin und verhindert die Polymerisation des Tubulins (Ravelli et al. 2004). 2 mg Colchicin wurden in 1 ml Parsons-Lösung gelöst. Diese Lösung wurde vor jedem Experiment frisch hergestellt.



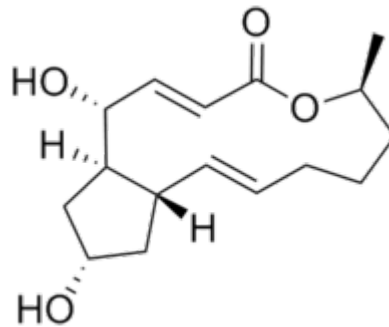
Colchicin

Abb. 5-8: Strukturformel des Colchicin

5. Material

5.7.3. Brefeldin A

Um die Proteintranslokation vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat zu hemmen (Misumi et al. 1986; Klausner et al. 1992), wurde Brefeldin A verwendet (Abb. 5-9). Brefeldin ist ein Produkt aus Schlauchpilzen (Ascomycota) (Sunagawa et al. 1983), zum Beispiel *Eupenicillium brefeldianum* (Tamura et al. 1968) 5 mg Brefeldin A wurden in 1783 μ l DMSO gelöst.

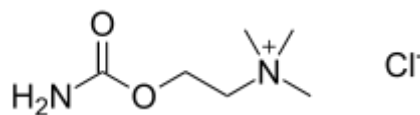


Brefeldin A

Abb. 5-9: Strukturformel des Brefeldin A

5.7.4. Carbachol

Carbachol (Abb. 5-10) stimuliert Acetylcholin-Rezeptoren (Soll 1981). 7,3 mg Carbachol wurde in 1 ml Tyrode-Lösung gelöst. Dann wurden 62,5 μ l dieser Stammlösung in 50 ml Tyrode-Lösung gelöst, um eine Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l zu erhalten.



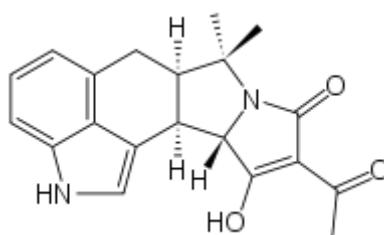
Carbachol

Abb. 5-10: Strukturformel des Carbachol

5. Material

5.7.5. Cyclopiazonsäure (CPA)

Cyclopiazonsäure (CPA; Abb. 5-11) ist ein Inhibitor der sarco/endoplasmatischen Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) (Goeger et al. 1988). CPA ist eine Indolderivat. Es wird als Mykotoxin z.B. aus *Penicillium cyclopium* isoliert (Holzapfel 1968). 1,18 mg CPA wurde in 100 μl DMSO gelöst; aus dieser Stammlösung wurden 14,3 μl zu 50 ml Parsons-Lösung pipettiert, um eine Endkonzentration von 10^{-5} mol/l zu erhalten.

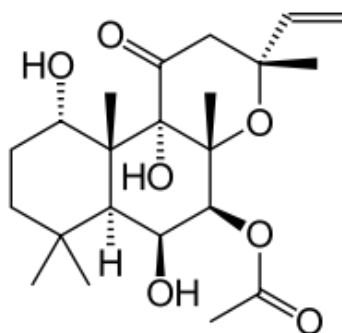


Cyclopiazonsäure

Abb. 5-11: Strukturformel der Cyclopiazonsäure (CPA)

5.7.6. Forskolin

Forskolin (Abb. 5-12) stimuliert Adenylatcyclasen und löst darüber eine Chlorid-Sekretion am Darmepithel aus (Tamada et al. 2001). Forskolin stammt aus dem indischen Heilkraut *Coleus forskohlii* (Kavitha et al. 2010). 1,3 mg Forskolin wurden in 100 μl Ethanol gelöst und dann in Tyrodelösung vor dem Versuch weiter verdünnt. Die Endkonzentration war $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Die Stammlösung ist lange haltbar.



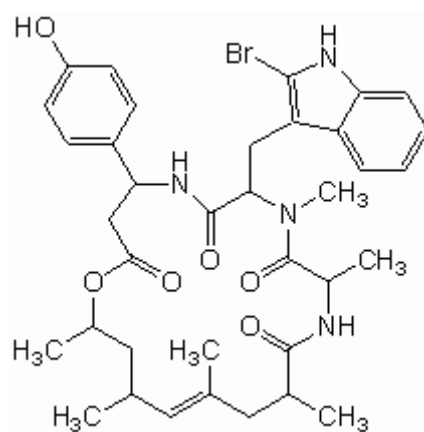
Forskolin

Abb. 5-12: Strukturformel des Forskolin

5. Material

5.7.7. Jasplakinolide

Jasplakinolide (Abb. 5-13) fördert die Aktinpolymerisation via Stabilisierung von F-Aktin (Bubb et al. 2000). Jasplakinolide ist ein Produkt des Schwammes *Jaspis johnstoni*. Es handelt sich um ein zyklisches Peptid, das fungizide und anti-proliferative Wirkungen aufweist (Bubb et al. 1994). Hundert µg Jasplakinolide wurden in 141 µl Methanol gelöst und vor dem Versuch in Tyrode-Lösung weiter verdünnt.



Jasplakinolide

Abb. 5-13: Strukturformel des Jasplakinolide

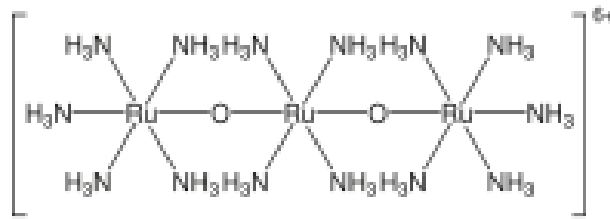
5.7.8. LaCl_3

Um speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle zu blockieren, wurde eine LaCl_3 -Lösung hergestellt (Kokoska et al. 1998). 37 mg LaCl_3 wurden in 100 µl Aqua dest. gelöst. Die Stammlösung wurde vor dem jeweiligen Versuch mit Tyrode weiter verdünnt. Die Endkonzentration war 1 mmol/l.

5.7.9. Rutheniumrot

Rutheniumrot (Abb. 5-14) ist ein Blocker von Ryanodin-Rezeptoren (Xu et al. 1998). Um eine Rutheniumrot-Lösung herzustellen wurden 3,9 mg Rutheniumrot zuerst in 1 ml Standard-Tyrodelösung gelöst. Dann wurde 1000 µl Rutheniumrot-Standard- Tyrodelösung in 100 ml Standard-Tyrodelösung verdünnt (Endkonzentration: $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l).

5. Material

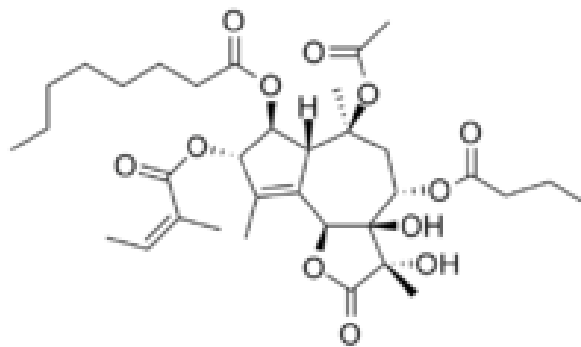


Rutheniumrot

Abb. 5-14: Strukturformel des Rutheniumrot

5.7.10. Thapsigargin

Um die sarko-endoplasmatische Calcium-ATPase (SERCA) zu blockieren wurde Thapsigargin (Abb. 5-15) verwendet (Rogers et al. 1995; Inesi et al. 2005). Thapsigargin stammt aus der Pflanze *Thapsia garganica* L., wo sie besonders in den Wurzeln vorkommt (Broegger Christensen et al. 1982). 0,65 mg Thapsigargin wurde in 1 ml DMSO gelöst. Sie wurde vor dem jeweiligen Versuch mit Tyrode weiter verdünnt, und die Endkonzentration war 10^{-6} mol/l. Diese Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.



Thapsigargin

Abb. 5-15: Strukturformel des Thapsigargin

5. Material

5.8. siRNA

Für die siRNA-Experimente wurde siGENOME Set of 4-Human STIM1 (Thermo Scientific Dharmacon, Lafayette, CO, USA) verwendet. Die Sequenzen der jeweiligen siRNAs sind folgende (Tabelle 5-12).

siGENOME Set of 4-Human STIM1

Cat#	Sequenz
D-011785-01	CAUCAGAAGUAUACAAUUG
D-011785-02	AGAAGGAGCUAGAAUCUCA
D-011785-03	AGGUGGAGGUGCAAUAUUA
D-011785-04	GGUGGUGUCUAUCGUUAUU

Tabelle 5-12: Sequenzen der siRNA des STIM1s

2 nmol siRNA wurden zuerst in 100 µl siRNA-Puffer (siehe 5.4.10.) gelöst, dann wurde 6 µl siRNA-siRNA-Puffer-Lösung in 194 µl Opti-MEM (siehe 5.4.10.) gelöst. Die Lösung wurde mit 100µl Lipofectamine-Lösung (siehe 5.4.10.) gemischt, was eine siRNA-Konzentration von 300 nmol/l ergab.

6. Methoden

6.1. Präparation des Gewebes

6.1.1. Herstellung eines Mukosa-Submukosa-Präparats

Die Betäubung der Ratten erfolgte mechanisch per Genickschlag. Zur Tötung der Versuchstiere wurde eine zervikale Dislokation mit nachfolgendem Entbluten durchgeführt (genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen). Anschließend wurde die Bauchhöhle über einen Schnitt an der Linea alba bis in den Thorax hinein eröffnet und ein Herzschnitt durchgeführt. Um das Freilegen des Darmes zu erleichtern, wurde zu beiden Seiten entlang der Rippenbögen ein Entlastungsschnitt angelegt. Das Kolon wurde vorsichtig vorgelagert und am distalen Ende (markiert durch einen großen Lymphknoten; Lindstrom et al. 1979) mit einer Schere durchtrennt. Der restliche Teil des Kolons wurde freigelegt und das Mesenterium entlang des Darms stumpf abpräpariert. Am Übergang zum Cecum wurde das Kolon mit der Schere abgesetzt.

Anschließend wurde der Dickdarm in einer eisgekühlten Parsons-Lösung mit Carbogenbegasung beziehungsweise in einer Tyrodelösung (ohne Carbogenbegasung) gelagert. Hier entspannte sich die Muskulatur des Darmstücks. Mit Hilfe einer Spritze wurde das Lumen gespült und auf einen Kunststoffstab (Durchmesser von 5 mm) aufgezogen. Am distalen Ende wurde mit einem stumpfen Skalpell vorsichtig eine Inzision gesetzt und die Tunica serosa sowie die Tunica muscularis von distal nach proximal abgelöst („gestrippt“) (Siefjediers et al. 2007). Es lagen danach nur noch folgende Zellschichten von serosal nach mucosal vor: Tela submucosa, Lamina muscularis mucosae, Lamina propria mucosae und Lamina epithelialis (siehe Abb. 6-1). Das so entstandene Mukosa-Submukosa-Präparat wurde entsprechend der geplanten Versuchsreihe (immunhistochemische Analyse oder Ussingkammer-Versuche) in etwa 3 cm lange Abschnitte unterteilt.

6. Methoden

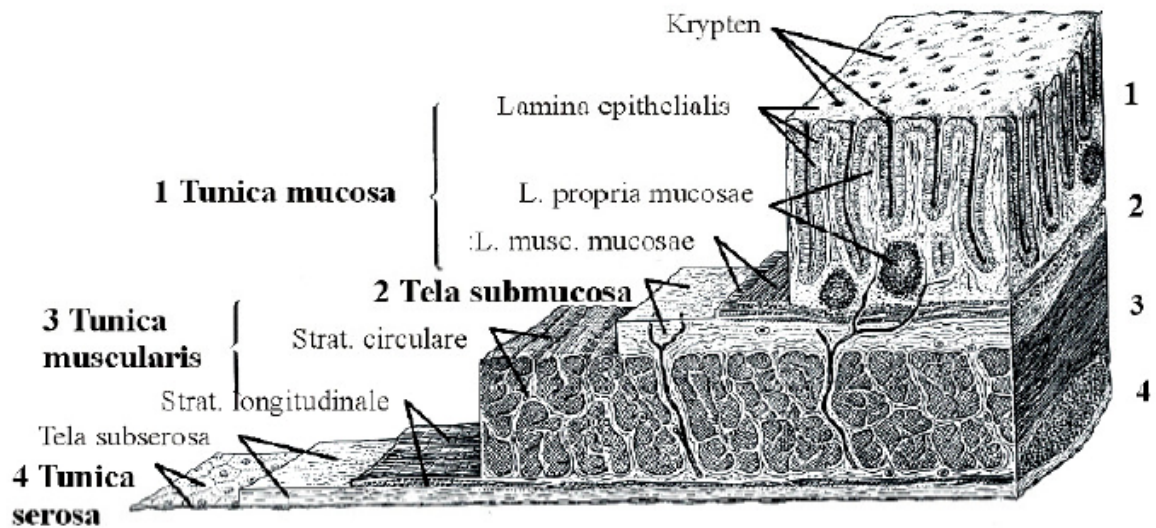


Abb. 6-1: Schematische Darstellung der Kolonwand.

Aus (Sobotta et al. 2006)

6.1.2. Inkubation des Gewebes

Um die Kolo-kalisation von STIM1 und Orai1 vor und nach Speicherentleerung zu vergleichen, wurde das Gewebe auf einen Plastikhalter wie in Abb. 6-2 dargestellt geklebt und in einem temperierten Gefäß (37 °C) unter Begasung (95 % O₂, 5 % CO₂ Vol/Vol) inkubiert. Um eine Ca²⁺-Speicherentleerung zu induzieren, wurden die Gewebe für 2 h in Ca²⁺-freier Parsons-Lösung in Gegenwart von Cyclopiazonsäure (10⁻⁵ mol/l) inkubiert. Die Kontrollgewebe wurden 2 h lang in Ca²⁺-haltiger Parsons-Lösung ohne Cyclopiazonsäure inkubiert. Dann wurde das Gewebe aus dem Halter entnommen, fixiert, gefärbt und mit Hilfe des Konfokalmikroskops durchgemustert (siehe 6.2.4., 6.2.7., 6.2.9., und 6.2.10.).

6.2. Immunhistochemische Analyse des Darmpräparates

6.2.1. Theorie der Immunofluoreszenz

Diese Technik wurde von Coons et al. im Jahr 1941 entwickelt (Coons et al. 1941). Das Ziel immunhistochemischer Untersuchungen ist es Proteine nachzuweisen. Voraussetzungen für immunhistochemische Fluoreszenz-Markierungen sind das Vorhandensein von antigenen Strukturen auf den zu untersuchenden Geweben oder Zellen und die Verfügbarkeit von

6. Methoden

spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern, meist vom IgG-Typ, die an das gesuchte Antigen binden können.

Die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen kann auf zwei verschiedene Arten überprüft werden, den direkten und den indirekten Nachweis. Beim direkten Nachweis ist der primäre Antikörper mit einem visuell detektierbaren Liganden gekoppelt, meistens einem Fluorophor. Wird dieser fluoreszierende Farbstoff mit Licht bei geeigneter Wellenlänge angeregt, emittiert dieser langwelliges Licht und dient somit der Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes. Bei der indirekten Nachweismethode besitzt der primäre Antikörper keine solche Kopplung mit einem detektierbaren Liganden. In diesem Fall bindet ein sekundärer, an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Antikörper an den unmarkierten primären Antikörper. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops kann dieser gesamte Komplex, bestehend aus einem Antigen, dem primären und dem sekundären Antikörper, schließlich lokalisiert werden (Coons 1958). Im Gegensatz zum direkten Nachweis, ist bei dieser Methode durch die höhere Sensitivität und die geringere Hintergrundfärbung eine Mehrfachmarkierung von verschiedenen Antigenen möglich. Ein Nachteil beider Arten von Fluoreszenzmarkierungen besteht in dem relativ raschen Ausbleichen der Fluorochrome bei Anregung im UV-Bereich. Dies kann durch spezielle Einbettmedien wie Citifluor (Newby Castleman, Leichester, England) zeitlich etwas verzögert werden (Janeway, Murphy 2009). In dieser Arbeit wurden mit der indirekten Methode Einfach- und Doppelmarkierungen durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primärantikörper aus verschiedenen Wirtstieren stammen und die Sekundärantikörper an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind.

6.2.2. Die verwendeten Antikörper

Die verwendeten Antikörper waren zum Teil polyklonalen und zum Teil monoklonalen Ursprungs. Polyklonale Antikörper werden aus dem Serum von immunisierten Tieren gewonnen. Es handelt sich also um ein Gemisch aus verschiedenen Antikörpern, die nach einer physiologischen Immunreaktion von verschiedenen B-Zellen produziert werden. Zwar erkennen alle gebildeten Antikörper das gleiche gesuchte Protein, aber jeweils an unterschiedlichen Epitopen. Bedingt durch die Heterogenität der polyklonalen Antikörper kann die unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz erhöht sein. Monoklonale Antikörper dagegen werden nur von einer auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehende Zelllinie

6. Methoden

(Zellklon) produziert und richten sich daher alle gegen das gleiche Epitop. Monoklonale Antikörper erreichen dadurch eine größere Spezifität (Noll et al. 2000). Bei der Auswahl der verwendeten Antikörper wurde darauf geachtet, dass der sekundäre Antikörper gegen das Immunglobulin der Tierart, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde, gerichtet ist. Das heißt jeder sekundäre Antikörper kann mit jedem primären Antikörper kombiniert werden, solange die Tierart übereinstimmt (Larsson 1988). Für die Experimente wurden die Primärantikörper und Sekundärantikörper aus den Tabellen 5-8 und 5-9 verwendet.

6.2.3. Negativkontrollen

Um die Spezifität der verwendeten Sekundärantikörper zu kontrollieren, wurde für jede Fluoreszenzmarkierung eine sogenannte Negativkontrolle durchgeführt. Hierbei wurden die Gewebestücke mit der Primärantikörper-Lösung ohne Zusatz des Primärantikörpers inkubiert. So konnte überprüft werden, ob der Sekundärantikörper unspezifische Bindungen mit dem Gewebe eingegangen war. Das Auftreten von Fluoreszenzsignalen in den Negativkontrollen hätte dabei auf unspezifische Bindungen hingewiesen. In einem solchen Fall hätte diese Versuchsreihe nicht ausgewertet werden dürfen, da die erhaltenen Fluoreszenzsignale nicht spezifisch für das gesuchte Antigen gewesen wären.

6.2.4. Paraformaldehydfixierung

Eine Gewebe-Fixierung ist aus folgenden Gründen erforderlich (Ramos-Vara 2005):

- (1) Zur Konservierung der Komponenten der Zelle, inklusive löslicher und unlöslicher Proteine.
- (2) Zur Vermeidung der Autolyse von Zell-Teilen durch Enzyme.
- (3) Zur Stabilisierung von Zellmaterialien gegen die schädlichen Wirkungen der Zeit.
- (4) Zur erleichterten Herstellung von herkömmlichen und immunhistochemischen Färbungen.

Paraformaldehyd-Fixierung (siehe 5.4.5.) wird besonders für den Zweck histologischer und immunhistochemischer Fixierungen verwendet (Hayat 2002). Formaldehyd konserviert vor allem Peptide und allgemeine Strukturen der Zellorganellen. Es wirkt auch auf Zellkerne, hat aber nur einen geringen Effekt auf Kohlenhydrate (Eltoum et al. 2001). Bei Vorhandensein von Calcium-Ionen, kann dieser Fixierungsstoff auch sehr gut Lipide konservieren (Bancroft, Gamble 2002). Die Grundlage der Formaldehyd-Fixierung ist die Formation zusätzlicher Produkte, die aus Formaldehyd und ungeladenen Aminogruppen

6. Methoden

mittels Cross-Link-Bildung entstehen (Dapson 1993).

Ein jeweils ca. 1,5 cm × 3 cm großes Stück Kolon wurde mit Cyanacrylatkleber auf Plastikhaltern befestigt (Schultheiss et al. 2002). Anschließend wurde das Gewebe in die Fixationslösung (siehe 5.4.5.) gestellt und für 12 Stunden aufbewahrt. Am nächsten Versuchstag folgten drei Waschschriffe zu jeweils 60 Minuten in Phosphatpuffer (siehe 5.4.2.).

6.2.5. Kryofixierung

Das Gewebe wurde grundsätzlich wie in 5.6.1. beschrieben vorbereitet. Das Gewebe wurde mit Paraformaldehyd (40 g/l) fixiert (siehe 5.4.5.). Vor der Paraformaldehyd-Fixierung wurde das Kolongewebe entlang der Medianlinie eröffnet, auf Plastikhalter geklebt und für 12 Stunden fixiert. Die Plastikhalter wurden dann horizontal in flüssige Gelatine (siehe 5.4.1.) eingebettet, sodass das Gewebe sowohl von oben als auch von unten mit jeweils ca. 1 cm Gelatine beschichtet wurde. Dieser Halter hat mittig eine ovale Aussparung (Abb. 6-2).

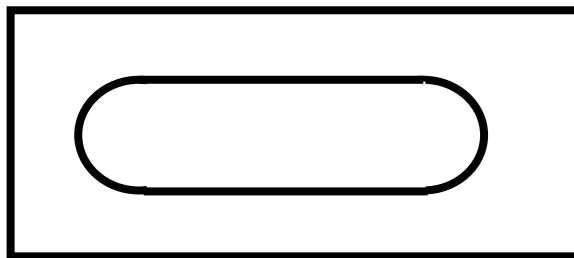


Abb. 6-2: schematische Skizze eines Plastikhalters für Gewebe-Einbettung

Zur Stabilisierung des Gewebes wurde randständig entlang dieser Aussparung das Gewebe mit einer Kanüle perforiert. Nach Abkühlung und Festigung der Gelatine wurden die Gewebestücke in einer Glasschale auf Eis gelagert und ca. 1 cm × 1 cm große Gewebe-Gelatine-Blöcke mit einem spitzen Skalpell aus der Aussparung herauspräpariert. Mit dem Gefriereinbettmedium Tissue Tec (Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) wurden die Blöcke auf Kork befestigt und für zwei Minuten in, durch flüssigen Stickstoff gekühltes, Isopentan (Temperatur ca. -160 °C) eingetaucht. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Blöcke bei -80 °C aufbewahrt (Heraeus HERA freeze, Kendro Laboratory products, Hanau, Deutschland).

6. Methoden

6.2.6. Herstellung der Gewebeschnitte

Zur Herstellung der Gewebeschnitte des distalen Kolons der Ratte wurde ein Kryostat der Firma Leica (Leica CM 3050S) verwendet. Bei einer Kühlkammertemperatur von $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Objekthaltertemperatur von $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnten mit diesem Gefriermikrotom Gewebeschnitte mit einer Schnittdicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt werden. Dazu wurde der gefrorene Gewebekblock mit Tissue Tec auf dem beweglichen Objekthalter fixiert. Die einzelnen Schnitte wurden direkt auf mit Gelatine beschichtete Objektträger übertragen und auf Eis gekühlt aufbewahrt. Zur Überprüfung der Schnittebene wurden jeweils die ersten Objektträger eines Versuchstages für eine Minute in Kresylviolett-Färbelösung getaucht, kurz trocknen gelassen und anschließend unter dem Mikroskop mit einem $10\times$ Objektiv untersucht. Wenn die Schnitte für die immunohistochemischen Markierungen in der richtigen Ebene lagen, wurden mit dieser Mikrotomeinstellung weitere Schnitte für die Versuchsreihe angefertigt.

6.2.7. Einfachmarkierung

Um die Existenz der intrazellulären Calciumsensoren STIMs (STIM1 und STIM2) und Calciumkanäle Orais (Orai1, Orai2, und Orai3) nachzuweisen, wurden diese Proteine immunhistochemisch sichtbar gemacht. Dazu wurden die Objektträger, auf denen sich die Gewebeschnitte befinden, direkt nach dem Anfertigen in Objektträgerhalter und diese in mit ca. 200 ml Phosphatpufferlösung gefüllte Färbeküvetten überführt. Diese wurden für 3 mal 5 Minuten auf einen Schüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, Deutschland) gestellt und somit rehydriert. Dabei wurde jeweils nach 5 Minuten der Puffer durch eine frische Lösung ersetzt. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mittels Inkubation für 2 Stunden mit einer Blockinglösung (siehe 5.4.6.) bei Raumtemperatur abgesättigt. Hierzu wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten nach unten weisend auf aus institutseigener Herstellung stammenden Inkubationsplatten aus Polycarbonat ausgelegt. Die Auflagefläche für die Objektträger auf den Inkubationsplatten war durch Klebeband geringfügig erhöht, so dass sich zwischen den Platten und den Gewebeschnitten ein kapillarer Spalt befand. 200 μl der Blockinglösung pro Objektträger wurden jeweils an den Rand dieses Spaltes pipettiert, woraufhin sich die Lösung durch die Kapillarkräfte in den Spalt zog. Die bestückten Inkubationsplatten wurden, um sie vor dem Austrocknen zu schützen, in einer geschlossenen, befeuchteten Metallkammer für die zweistündige Absättigung aufbewahrt.

6. Methoden

Nach der Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte mit derselben Technik mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Inkubationszeit hierfür betrug 24 Stunden bei 4 °C. Die entsprechenden Konzentrationen der Primärantikörper sind der Tabelle 5-5 zu entnehmen. Am folgenden Tag wurden die Objektträger wiederum für 3 mal 5 Minuten in Färbeküvetten auf dem Schüttler in Phosphatpufferlösung (PB) gewaschen, um die überschüssigen, ungebundenen Primärantikörper vom Präparat zu entfernen. Nach 5 Minuten wurde die jeweilige Pufferlösung durch frische ersetzt. Danach folgte die Markierung der Primärantikörper mittels konjugierter Sekundärantikörper. Die zweite Antikörperlösung wurde, wie für das Blocking und die Primärantikörperinkubation, in den Kapillarspalt zwischen Objektträger und Inkubationsplatten pipettiert und in der feuchten Metallkammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die entsprechenden Sekundärantikörper-Konzentrationen sind der Tabelle 5-9 zu entnehmen. Ab diesem Zeitpunkt wurden sämtliche Arbeitsschritte unter Lichtschutz durchgeführt, um ein vorzeitiges Verblassen der Schnitte zu vermeiden.

Nach der Sekundärantikörperinkubation wurden die Schnitte wieder in Färbeküvetten überführt und für 3 mal 5 Minuten auf dem Schüttler in oben beschriebener Art und Weise in PB gewaschen. Dann wurden für eine spätere bessere Orientierung im Gewebe die Zellkerne der Gewebeschnitte in einer Färbeküvette mit einer 300 nmol/l DAPI-Lösung (siehe 5.6.5.) für 5 Minuten auf dem Schüttler gefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert vornehmlich in AT-(Adenin und Thymin)-reiche Sequenzen der DNA-Doppelhelix und lässt sich nach Anregung mit Ultraviolett-Licht als cyanblaues Fluorophor in allen Zellkernen nachweisen (Tanius et al. 1992). Im Anschluss folgten vier fünfminütige Waschschrte in Phosphatpufferlösung. Zum Schluss folgte das sogenannte Eindeckeln der Schnitte. Dazu wurde auf jeden einzelnen Schnitt jeweils ein Tropfen Hydromount (National diagnostics, Atlanta, Georgia, USA) vorgelegt und darauf vorsichtig und luftblasenfrei ein Deckgläschen aufgelegt, welches mit klarem Nagellack fixiert wurde. Nach dem Trocknen des Nagellacks wurden die Präparate innerhalb der nächsten 12 Stunden ausgewertet. Tabelle 6-1 zeigt ein exemplarisches Protokoll einer Einfachmarkierung mit anschließender DAPI-Kernfärbung.

6. Methoden

	Ausführung	Reagenz	Temperatur	Zeit
1	Rehydrierung	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 mal 5 min
2	Blockierung (unspezifischer Bindungsstellen)	Blockinglösung	Raumtemperatur	2 h
3	Inkubation (Primärantikörper)	Primärantikörper-Lösung Primärantikörper	4 °C	24 h
4	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 mal 5 min
5	Inkubation (Sekundärantikörper)	Sekundärantikörper-Lösung Sekundärantikörper	Raumtemperatur Lichtschutz	1 h
6	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur Lichtschutz	3 mal 5 min
7	Kernfärbung	DAPI-Lösung	Raumtemperatur, Lichtschutz	5 min
8	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur Lichtschutz	4 mal 5 min
9	Eindeckeln	1 Tropfen Hydromount/Schnitt	Raumtemperatur Lichtschutz	
10	Lagerung		4 °C Lichtschutz	bis zu 2 d

Tabelle 6-1: Färbeprotokoll für die einfache Fluoreszenzmarkierung

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind unter 5.4.2., 5.4.6., 5.5.1., 5.5.2., 5.6.1., 5.6.5. aufgelistet. Bei jeder Versuchsreihe wurden Negativkontrollen, wie in 6.2.3. beschrieben, angefertigt.

6. Methoden

6.2.8. Doppelmarkierung

Um eine mögliche Kolo­kalisierung des STIM1 mit dem Orai1 im distalen Rattenkolon nachzuweisen, wurden Doppelmarkierungen durchgeführt. Zur Anfertigung der Doppelmarkierungen, wurde folgendes Protokoll verwendet (Tabelle 5-19):

	Ausführung	Reagenz	Temperatur	Zeit
1	Rehydrierung	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 mal 5 min
2	Blockierung (unspezifischer Bindungsstellen)	Blockinglösung	Raumtemperatur	2 h
3	Inkubation (Primärantikörper)	Primärantikörper-Lösung Primärantikörper gegen STIM1 und Orai1	4 °C	36 h
4	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 mal 5 min
5	Inkubation (Sekundärantikörper)	Sekundärantikörper-Lösung zwei verschiedene Sekundärantikörper	Raumtemperatur Lichtschutz	2 h
6	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur Lichtschutz	3 mal 5 min
7	Kernfärbung	DAPI-Lösung	Raumtemperatur, Lichtschutz	5 min
8	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur Lichtschutz	5 mal 5 min
9	Eindeckeln	1 Tropfen Hydromount/Schnitt	Raumtemperatur Lichtschutz	
10	Lagerung		4 °C Lichtschutz	bis zu 2 d

Tabelle 6-2: Färbeprotokoll für die Doppel-Fluoreszenzmarkierung STIM1-Orai1

6. Methoden

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind unter 5.4.2., 5.4.6., 5.5.1., 5.5.2., 5.6.1., 5.6.5. aufgelistet.

Die Inkubation mit den Antikörpern gegen STIM1 und gegen Orai1 wurde zusammen durchgeführt. Danach wurde die Inkubation mit Sekundärantikörpern durchgeführt, wobei zwei verschiedene Antikörper verwendet wurden. Für den Antikörper gegen STIM1 wurde ein Alexa Fluor®488-konjugierter Sekundärantikörper und für den Antikörper gegen Orai1 wurde ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Auch bei der Doppelmarkierung wurde eine Zellkernfärbung mit DAPI zur besseren Gewebeorientierung durchgeführt. Gewebeschnitte, die mit dem Konfokalmikroskop analysiert wurden, erhielten keine Zellkernfärbung mit DAPI, weil dieser Farbstoff sich nach Anregung mit Ultraviolett-Licht darstellen lässt, und dieses bei dem verwendeten Konfokalmikroskop nicht vorhanden ist (Denk et al. 1990).

Um die genaue Lokalisation des STIM1 im distalen Rattenkolon herauszufinden, wurden Doppelmarkierungen zwischen STIM1 und den Terminal Webs angefertigt. Das sogenannte Terminal Web (siehe Abb. 6-3) ist eine faserartige Struktur, die an der apikalen Oberfläche der Darmepithelzellen liegt und einen Teil des Zytoskeletts darstellt (Hull, Staehelin 1979). Die Terminal Webs werden vor allem von Aktinfilamenten gebaut, diese Struktur liegt an der apikalen Seite der Zellen (Mooseker 1975; Drenckhahn 1988). Aus diesem Grund wurden die Terminal Webs in diesem Experiment als Marker für die apikale Seite der Zellen verwendet.

6. Methoden

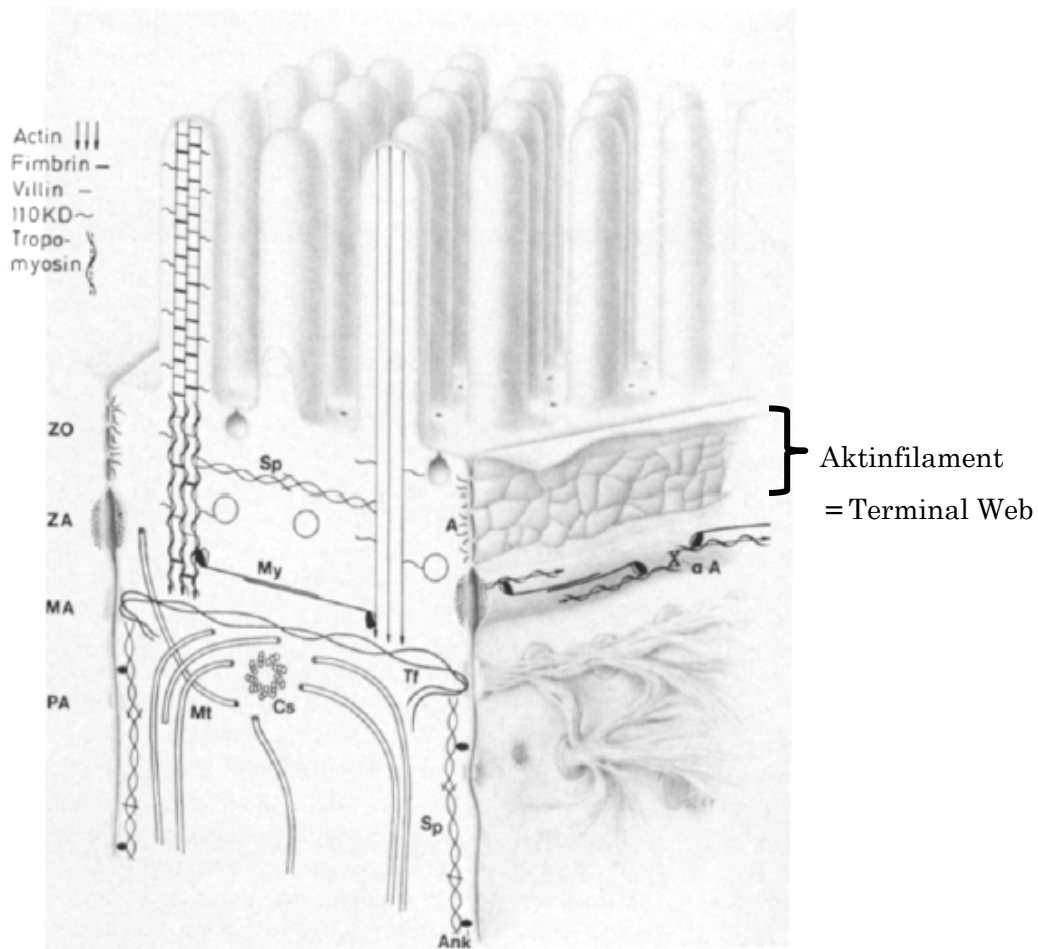


Abb. 6-3: Terminal Web.

Aus (Drenckhahn 1988)

6. Methoden

Die Doppelmarkierung wurde nach diesem Protokoll (Tabelle 6-3) hergestellt.

	Ausführung	Reagenz	Temperatur	Zeit
1	Rehydrierung	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 mal 5 min
2	Blockierung (unspezifischer Bindungsstellen)	Blockinglösung	Raumtemperatur	2 h
3	Inkubation (Primärantikörper)	Primärantikörper-Lösung gegen STIM1 und Phalloidin-FITC-Lösung	4 °C	36 h
4	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 mal 5 min
5	Inkubation (Sekundärantikörper)	Sekundärantikörper-Lösung gegen STIM1-Antikörper	Raumtemperatur Lichtschutz	2 h
6	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur Lichtschutz	3 mal 5 min
7	Eindeckeln	1 Tropfen Hydromount/Schnitt	Raumtemperatur Lichtschutz	
8	Lagerung		4 °C Lichtschutz	bis zu 2 d

Tabelle 6-3: Färbeprotokoll für die Doppel-Fluoreszenzmarkierung STIM1-Terminal Web

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind unter 5.4.2., 5.4.6., 5.5.1., 5.5.2., 5.6.1., 5.6.5. aufgelistet. Die Inkubation mit den Antikörpern gegen STIM1 und mit der Phalloidin-FITC-Lösung wurden zusammen durchgeführt. Danach wurde die Inkubation mit dem Sekundärantikörper durchgeführt, wobei nur der Cy3-konjugierte Sekundärantikörper gegen STIM1-Antikörper verwendet wurde. Weil die Gewebe mit Hilfe des Konfokalmikroskops analysiert wurden, wurde keine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt. Bei jeder Versuchsreihe wurden Negativkontrollen (siehe 6.2.3.) angefertigt.

6. Methoden

6.2.9. Mikroskopie

Die Analyse der Gewebeschnitte wurde an einem Eclipse 80i Mikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt. Zur Erzeugung der benötigten Anregungswellenlängen verfügt das Mikroskop über spezielle Filterköpfe. Die Cy3-konjugierten Antikörper wurden mit einer Wellenlänge von 510 – 530 nm angeregt und emittierten Licht mit einer Wellenlänge von 630 – 660 nm. Die Alexa Fluor®488-konjugierten Antikörper konnten durch Licht der Wellenlänge 450 – 490 nm angeregt werden. Die Emission erfolgte bei einer Wellenlänge von 510 – 530 nm. Zur Anregung des Kernfarbstoffs DAPI diente Licht der Wellenlänge 358 nm. Das emittierte Licht hatte dann eine Wellenlänge von 461 nm. Die Bilddokumentation erfolgte über eine digitale Schwarz/Weiß-Kamera (S/W camera Digital Sight DS 2 M BWc, Nikon). Mit Hilfe des Software-Programms NIS-Elements 2.30 (Nikon) wurden die Schwarzweißbilder entsprechend der emittierten Lichtfarbe eingefärbt. So sind Cy3-Signale immer rot dargestellt, Alexa Fluor®488 immer grün und DAPI-Kernsignale immer blau. Das Fotografieren der betreffenden Gewebeausschnitte mit den entsprechenden Filtern und anschließender Überlagerung der Farbkanäle erleichterte die Lokalisation der Cy3-Signale. Zur Befunddokumentation, zum Beispiel mittels einer Bildtafel, wurde gegebenenfalls eine Kontrastverstärkung oder ein Farbabgleich notwendig. Dazu wurde die Adobe Photoshop Imaging-Software verwendet.

6.2.10. Konfokalmikroskopie

Die weitere Analyse der Gewebeschnitte, besonders für die Analyse der doppelmarkierten Gewebe, wurde an einem Leica TCS SL Spectral Confocal Microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Laser-Rastermikroskop) setzt zur Beleuchtung einen Laser ein, der in der Fokusebene punktwise das Objekt beleuchtet und dort in jedem Punkt Fluoreszenzmoleküle anregt. Das Fluoreszenzlicht wird auf eine Blende in der Bildebene abgebildet, wobei nur das Licht, das direkt aus der Fokusebene kommt, detektiert wird. Die vollständige Fokusebene wird mit Hilfe eines Rasterkopfs in x- und y- Richtung abgebildet. Dabei wird der Laserstrahl mit einem beweglichen Spiegelsystem über das Objekt geleitet. Der Durchmesser der Detektor-Blende bestimmt zusammen mit dem Mikroskopobjektiv und dessen numerischer Apertur die Dicke des optischen Schnitts. Dieser liegt im Bereich des 2- bis 2,5-fachen der lateralen Auflösung.

6. Methoden

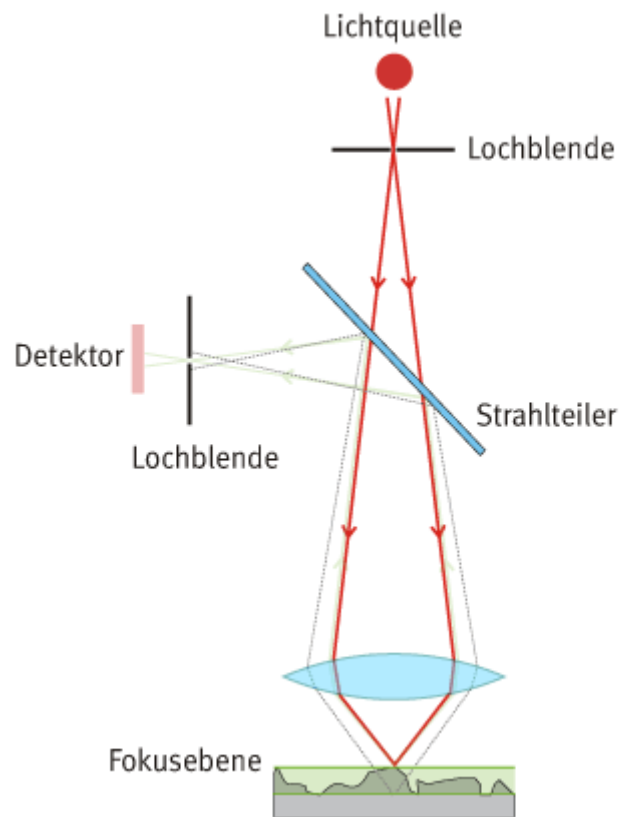


Abb. 6-4: Prinzipieller Aufbau eines konfokalen Mikroskops.

Aus: <http://www.konfokalmikroskop.de/>

6. Methoden

6.3. Ussingkammer-Versuche

6.3.1. Theorie der Ussingkammer-Technik

Anfang der 1950er entwickelte der dänische Physiologe Hans H. Ussing die Kurzschlussstrom- oder Ussingkammer-Technik (Ussing, Zerahn 1951). Diese Methode bietet eine Reihe von Vorteilen im Vergleich zur Registrierung von Radioisotopenfluxen zur Messung von Ionentransportprozessen. Erstens ist diese Methode viel empfindlicher als die Methode, die Isotope verwendet. Zweitens ermöglicht sie die Erfassung schneller Reaktionen in Echtzeit. Außerdem ist sie leicht zu erlernen. Aber als Nachteil kann diese Methode nicht identifizieren, welche Ionen tatsächlich transportiert werden, weil sie nur den Gesamtstrom misst. Es ist jedoch möglich, die fließenden Ionen pharmakologisch mit Hilfe spezifischer Blocker zu identifizieren (Karaki, Kuwahara 2004).

Mit dieser Technik können elektrogene Transportprozesse an Epithelien verschiedener Organe gemessen werden. Um mit Hilfe der Ussingkammer transepitheliale Potentialänderungen theoretisch zu beschreiben, entwickelten Ussing und Zehran ein Ersatzschaltkreismodell. In diesem System wird das eingespannte Gewebe als Widerstand bzw. Batterie betrachtet. Die Widerstände der basolateralen und der apikalen Membran sind dabei in Reihe geschaltet.

6. Methoden

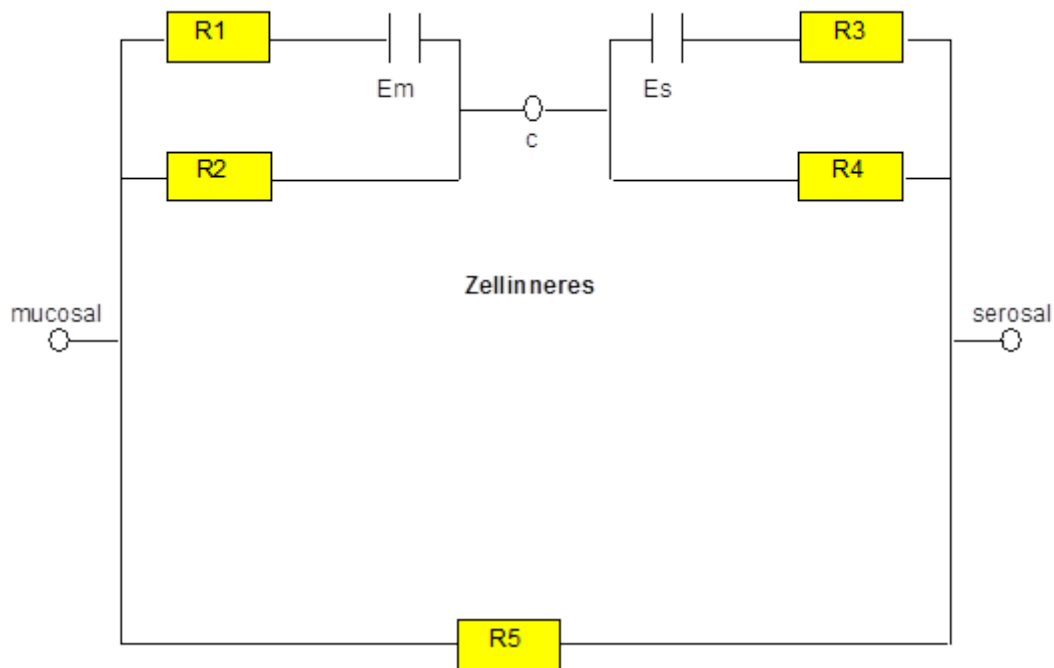


Abb. 6-5: Ersatzschaltkreismodell von Ussing und Zerahn (1951) für ein Epithel

R1 = Innenwiderstand der apikalen Membran [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]

R2 = Widerstand der apikalen Membran [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]

R3 = Innenwiderstand der basolateralen Membran [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]

R4 = Widerstand der basolateralen Membran [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]

R5 = parazellulärer Widerstand [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]

Em = Potential an der apikalen Membran [mV]

Es = Potential an der basolateralen Membran [mV]

Zwischenzeitlich wurde die spezielle Software Winclamp (Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen, Deutschland) entwickelt, die eine vollständige Steuerung des Systems per Computer ermöglicht und die elektrischen Parameter wie Kurzschlussstrom (I_{sc} = short circuit current), Gewebeleitfähigkeit (G_t = transmural electrical conductance) oder transepitheliale Potentialdifferenz (Pd) kontinuierlich erfasst. Hierzu verfügten die Ussingkammern über zwei unterschiedliche Elektrodenpaare, die über Agarbrücken (50 g/l Agar in Standard-Tyrodellösung) mit den Kammern verbunden waren. Das erste Elektrodenpaar war gewebe nah in nur 1 mm Entfernung von der Schleimhaut angebracht, um Messartefakte, bedingt durch einen Potentialabfall durch den

6. Methoden

Lösungswiderstand, zu minimieren. Das zweite Elektrodenpaar (Ag/AgCl-Elektroden) diente der Stromapplikation und wurde möglichst weit von dem Gewebe entfernt angebracht, um eine gleichmäßige Stromdichte im Bereich des Gewebes zu erzeugen.

Die Messeinrichtung erlaubte das Umschalten zwischen zwei Mess-Modi, „Open-circuit-Modus“ und „Voltage-clamp-Modus“. Damit das Gewebe nach dem Einspannen zunächst unbeeinflusst wieder zu Gleichgewichtsbedingungen finden konnte, wurde bei jedem Versuch anfangs der „Open-circuit-Modus“ gewählt. Bei diesem Modus erfolgt eine direkte Messung der transepithelialen Potentialdifferenz. Beide Seiten der Kammer waren mit 3,5 ml derselben Lösung gefüllt. Somit wurden hydrostatischer Druck und chemische Gradienten als Antriebskräfte für Stofftransport ausgeschaltet und es lag lediglich der elektrische Gradient, der durch spontane Ionenbewegungen gebildet wird, vor (Karaki, Kuwahara 2004).

Typisch für das Kolongewebe der Ratte ist eine spontane Sekretion von Anionen, vor allem von Cl^- und HCO_3^- (Strabel 1995). Dadurch wird die serosale (basolaterale) Seite gegenüber dem Lumen (mucosale oder apikale Seite genannt) positiv aufgeladen. Nach ca. 1 min wurde dann in den „Voltage-clamp-Modus“ gewechselt. Durch Einspeisen eines Stroms kann hierbei die transepitheliale Potentialdifferenz auf einen beliebigen Wert eingestellt werden. Der kompensatorische Strom, der notwendig ist, um diese Potentialdifferenz auf 0 mV zu klemmen, wird als Kurzschlussstrom (I_{sc} für short-circuit current) bezeichnet. Der I_{sc} entspricht in seiner Größe somit der Summe aller elektrogenen Ionenbewegungen am Epithel. Eine unter diesen Bedingungen gemessene Zunahme des I_{sc} ist damit immer auf einen aktiven Transport zurückzuführen. Der I_{sc} wurde in $\mu\text{Eq/h/cm}^2$ (mit $1 \mu\text{Eq/h/cm}^2 = 26,9 \mu\text{A/cm}^2$) als Ladungsverschiebung pro Zeit und freier Gewebefläche angegeben.

Zur vollständigen Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften des Gewebes wurden zusätzlich der Gewebewiderstand (R_t) und die Gewebeleitfähigkeit ermittelt. Hierzu wirkten während der Messungen im Voltage-clamp-Modus Stromimpulse mit einer Amplitude von $\pm 50 \mu\text{A}$ für eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe ein. Mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes konnte aus der resultierenden Potentialdifferenz der Gewebewiderstand ($R_t = U/I$) bzw. die Gewebeleitfähigkeit ($G_t = I/U$) errechnet werden.

6. Methoden

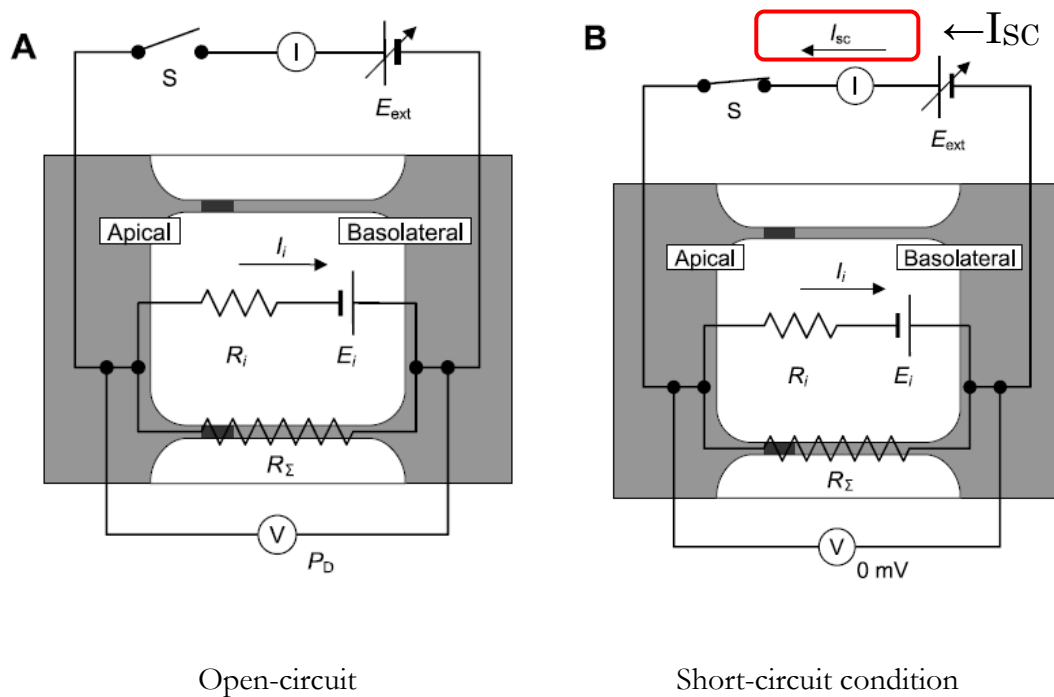


Abb. 6-6: Schaltbilder für die (A) Open-circuit und (B) Short-circuit Messbedingung.

Aus (Karaki, Kuwahara 2004)

6.3.2. Die Messkammer

In meinen Versuchen wurden Messkammern eingesetzt, die aus zwei Plexiglaskammerhälften bestanden, die mittels Plexiglasschrauben miteinander verbunden waren. Um einen wasserdichten Verschluss zu erhalten, wurde im Bereich der Kontaktflächen der beiden Kammerhälften ein dünner Silikonfilm aufgetragen. Zwischen beiden Hälften wurde ein Gewebestück mit einer Oberfläche von 1 cm^2 gespannt. Feine Metallstifte an der einen Kammerhälfte fixierten das Gewebe. Es fungierte somit als Grenzfläche zwischen zwei mit Pufferlösung gefüllten Kammerkompartimenten. Das Volumen der Kompartimente betrug jeweils 3,5 ml. An der Oberseite der Kammer war für jede Seite ein Zugang vorhanden, über den die Lösungen getauscht oder Wirkstoffe zugegeben werden konnten. Während der gesamten Versuchsdauer wurden das Gewebe und die Pufferlösungen über einen temperierten Wasserzulauf auf konstanten 37°C gehalten. Eine ständige Begasung mit Carbogen über zwei Gasfritten am Boden der Kammern sorgte für eine ausreichende Versorgung des Darmgewebes mit Sauerstoff und für einen konstanten pH-Wert von 7,4. Unter diesen Bedingungen bleiben die epithelialen Funktionen bis zu sechs Stunden nach Organentnahme

6. Methoden

erhalten, ohne dass morphologische Veränderungen am Epithel auftreten (Diener, Rummel 1989).

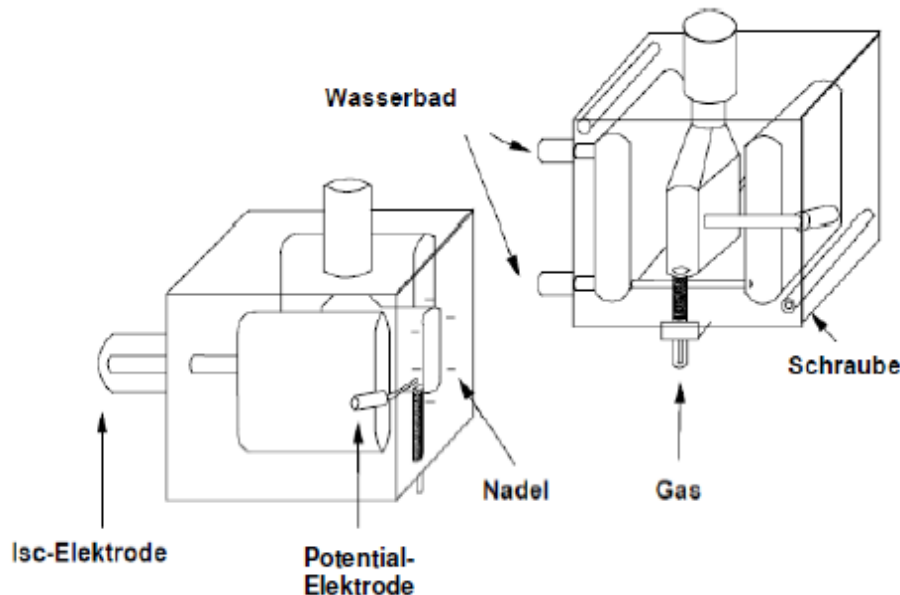


Abb. 6-7: Schema einer modifizierten Ussingkammer

6.3.3. Versuchsdurchführung und Datenerfassung

Nach dem Einspannen des Gewebes wurde die Messkammer mit Standard-Tyrodellösung befüllt. Um den Gewebewiderstand zu stabilisieren, wurde eine 60-minütige Äquilibrationsphase unter short-circuit-Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden je nach Versuchsreihe in einer oder beiden Kammerseiten die Standard-Tyrodellösung mit anderen Pufferlösungen ausgetauscht und/oder verschiedene Substanzen appliziert. Über eine computergeschützte automatische Voltage-Clamp-Anlage (Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen, Deutschland) wurden kontinuierlich Kurzschlussstrom, Gewebeleitfähigkeit, und Potentialdifferenz erfasst und gespeichert. Zu Beginn jeder Messung wurde die Potentialdifferenz zwischen den einzelnen Elektroden und der Widerstand der verwendeten Lösungen bestimmt und von den Messdaten subtrahiert. Am Ende des Versuchs wurden die Minutenwerte und deren graphische Darstellung ausgedruckt.

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Daten in ein Tabellen-Kalkulations-Programm (Lotus 123) exportiert. Als Basallinie (Baseline) galt der Kurzschlussstrom unter basalen Versuchsbedingungen, der vor Substanzzugabe als Durchschnittswert des Isc aus den letzten

6. Methoden

drei Minuten ermittelt wurde. Der höchste Wert nach Calcium-Stamm-Lösungzugabe wurde als Calcium-Peak gewertet und die Veränderung zwischen Baseline und Calcium-Peak als ΔIsc berechnet.

6.4. Zellkultur

6.4.1. Auftauen der Zellen

Es wurde die Kolonepithelzelllinie HT29/B6 (Noguchi et al. 1979; Bojarski et al. 2001) von mir eingesetzt. Die eingefrorenen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und unter einer Sterilwerkbank (LaminAir LB-48-C, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) zunächst in ein Röhrchen mit 10 ml Medium (Ready mix RPMI mit Penicillin, siehe 5.4.9.) überführt. Dann wurden die Zellen 5 Minuten abzentrifugiert und danach der Überstand abgesaugt. 8 ml Medium wurde zu dem Röhrchen gegeben, dann wurde die Röhrchen zugeschraubt und aufgeschüttelt. Der Inhalt jedes Röhrchens wurde auf 2 Platten (Durchmesser 6 cm) aufgeteilt (jeweils 4 ml), dazu wurde jeweils 2 ml Medium zugegeben. Waren die Zellen 80 – 90 %, konfluent (dies dauert mindestens 2 Wochen), wurden sie in zwei Kulturschalen (Durchmesser 6 cm) passagiert.

6.4.2. Mediumwechsel

Ein Mediumwechsel wurde dreimal pro Woche durchgeführt. Dabei wurde das alte Medium abgesaugt, danach wurden 6 ml neues Medium zugegeben. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet.

6.4.3. Passagieren

Zum Erhalt der Zellkultur wurden die Zellen in Kulturschalen mit Durchmesser 6 cm vermehrt. Bei einer Konfluenz von 80 – 90 % erfolgte ihre Splittung. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit 3 ml Hank's BSS ohne Calcium/Magnesium (siehe 5.4.9.) gewaschen und anschließend 1 ml Trypsin-Lösung (siehe 5.4.9.) auf die Zellen gegeben, dieses gut verteilt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Durch Klopfen an der Kulturschale konnten die Zellen vom Untergrund abgelöst und anschließend die Trypsinierung durch Zugabe von 1ml Ready mix RPMI Medium (siehe 5.4.9.) gestoppt werden. Danach wurden die Schale mit Hank's BSS (siehe 5.4.9.) zweimal gewaschen. Hank's BSS wurde jemals 1 ml

6. Methoden

verwendet. Diese Zell-Suspension wurde in einem 15 ml Röhrchen gesammelt. Dann die Zell-Suspension wurde bei 1100 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Medium über dem Zell-Pellet vorsichtig abgesaugt und in 6 – 10 ml Medium (nach Bedarf variiert) suspendiert. Um das Zell-Pellet im Medium zu lösen, wurde das Röhrchen für 30 Sekunden auf den Rüttler geschüttelt. Die Zellzahl in der Zell-Suspension wurde gezählt. Für diesen Zweck wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

6.5. Calcium-Imaging mit Fura-2 AM

6.5.1. Theorie des Calcium-Imagings

Veränderungen der cytosolischen Calcium-Konzentration vermitteln intrazelluläre Signalübertragungen, da Calcium-Ionen als Second-Messenger dienen. Um diese Art von Signalübertragung zu untersuchen, kann man die sich verändernde Calcium-Konzentration mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen bildlich darstellen. Die Fluoreszenzfarbstoffe können in zwei Gruppen unterteilt werden, die wavelength stable dyes (wellenlängenstabile Farbstoffe) und die wavelength shifting dyes (wellenlängeändernde Farbstoff). Bei erstgenannten Fluoreszenzindikatoren ändert sich durch Bindung von Calcium nur die Emissionsintensität, die Anregungs- und Emissionswellenlängen bleiben konstant. Für die Imagingversuche in dieser Studie wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 verwendet, welcher zu den wavelength shifting dyes gehört. Wenn Calcium an den Farbstoff bindet, ändert sich dessen Anregungswellenlänge.

6. Methoden

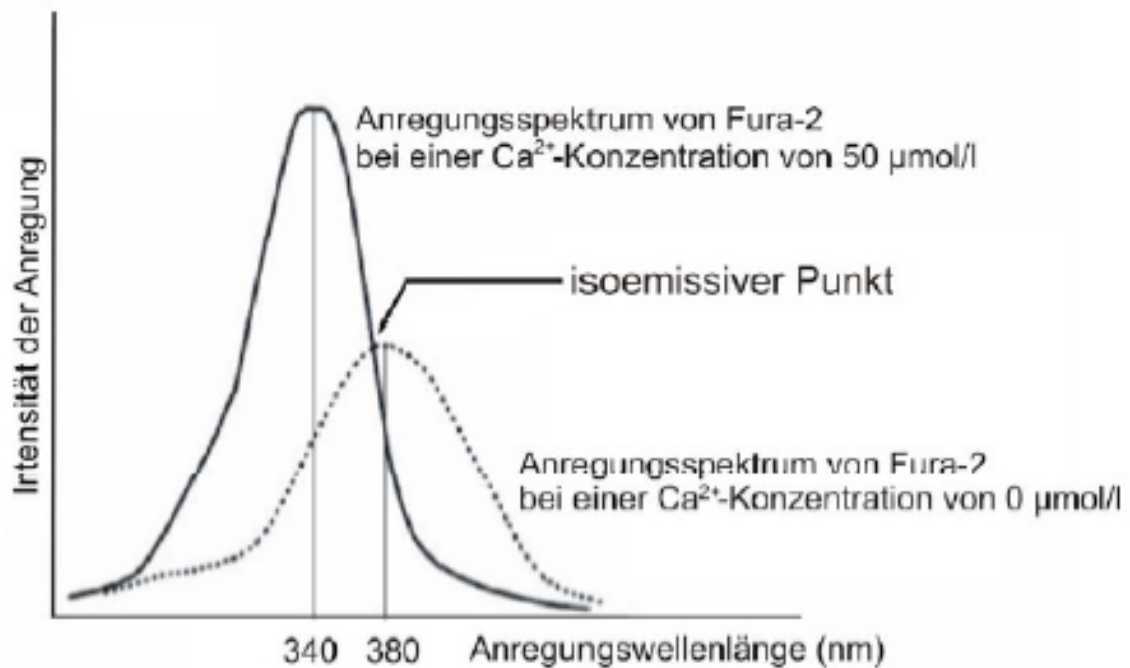


Abb. 6-8: Anregungsspektren von Fura-2 bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen
(Die Messung der Emission erfolgt bei 510 nm.)

Der Vorteil dieser wellenlängenändernden Fluoreszenzfarbstoffe ist die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen Calcium-freiem und Calcium-gesättigtem Farbstoffanteil – so kann eine Verhältnis-Messung (Ratio-Messung) durchgeführt werden, wobei die Emissionswerte des ionengebundenen Anteils durch die des freien Farbstoffes dividiert werden. Dabei findet eine zeitlich unmittelbar hintereinander abwechselnde Anregung bei 340 nm und 380 nm statt. Die jeweilige Emission bei 510 nm wird gemessen und daraus das Verhältnis gebildet. Für den an Calcium gebundenen Farbstoff liegt das Anregungsmaximum bei 340 nm. Das Anregungsmaximum des ungebundenen Fura-2 liegt bei 362 nm. In der Praxis wird allerdings nicht bei 362 nm gemessen, da dies sehr nah am isoemissiven Punkt des spezifischen Spektralverhaltens von Fura-2 liegt. An diesem Punkt ist die Fluoreszenzintensität von Fura-2 unabhängig von der Calcium-Konzentration immer gleich. Gemessen wird stattdessen bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm. Hier ist die Differenz der Fluoreszenzintensität für Calcium-freies und Calcium-gebundenes Fura-2 am größten. Der Quotient für die Ratio-Messung setzt sich demnach aus der Emission der Anregung bei 340 nm und 380 nm zusammen.

6. Methoden

Diese Ratio-Messung bringt gegenüber der Einzelwellenlängenmessung einige Vorteile mit sich. Die erfassten Werte der cytosolischen Calcium-Konzentration sind dabei unabhängig von der absoluten Konzentration an Farbstoff in der Zelle. Auch Faktoren wie Zelldicke und Zellgröße spielen keine Rolle. Zudem werden Fehlermöglichkeiten, die durch Ausbleichen oder Heraustransport des Farbstoffs aus der Zelle entstehen könnten, reduziert, da sie bei beiden Wellenlängen die gleiche Auswirkung haben und so durch Bildung der Ratio entweder ganz wegfallen oder zumindest minimiert werden (Tsien, Poenie 1986). Aus der im Versuch gemessenen Ratio (Emission [340nm]/Emission [380nm]) kann die intrazelluläre Calcium-Konzentration theoretisch errechnet werden (Grynkiewicz et al. 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht die genaue Calcium-Konzentration berechnet, sondern – wie heute in der Literatur auch meist üblich – ihre relative Änderung über die Veränderung der Ratio protokolliert, da das Fura-2-Signal unter anderem auch von der Anwesenheit cytosolischer Proteine beeinflusst wird, was bei der extrazellulären Kalibrierung des Fura-Signals nicht erfasst wird.

6.5.2. Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM

Fura-2 ist ein Fluoreszenz-Indikator-Farbstoff mit der Grundstruktur eines Calcium-Chelators mit hoher Calcium-Selektivität (Tsien 1980) (Abb. 6-9, B), genauer einer EGTA [Ethylenglycol bis-(β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure] –Grundstruktur (Abb. 6-9, A).

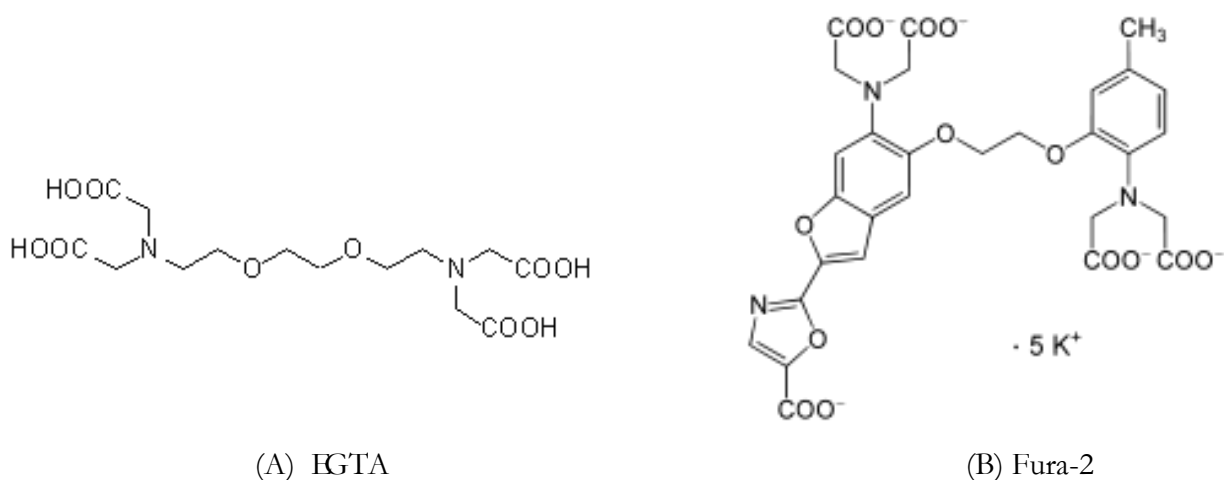


Abb. 6-9: Strukturformel des EGTA (A) und des (B)Fura-2

6. Methoden

Diese Struktur verleiht dem Farbstoff eine sehr hohe Selektivität für Calcium-Ionen, wodurch die Bildung eines Chelatorkomplex aus Fura-2 und Calcium ermöglicht wird. Die Bindungskurve verläuft sigmoidal und ist in Abb. 6-10 in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration dargestellt. Die Dissoziationskonstante (K_d) ist der Wert, bei dem 50 % des Fura-2 an Calcium gebunden ist. Je kleiner der K_d -Wert, desto stärker ist die Affinität des Farbstoffs für das Ziel-Ion. Für Fura-2 liegt der K_d -Wert bei einer Calcium-Konzentration von 224 nmol/l. In den meisten Zellen liegt die Konzentration an freiem Calcium unter Ruhebedingungen nur bei etwa 100 nmol/l. Dieser Bereich ist durch das graue Quadrat in Abb. 6-10 gekennzeichnet. Das bedeutet, dass bei einer Erhöhung der Calcium-Konzentrationen auf einen Stimulus hin noch genug Spielraum nach oben besteht, bevor eine Sättigung des Farbstoffs eintritt.

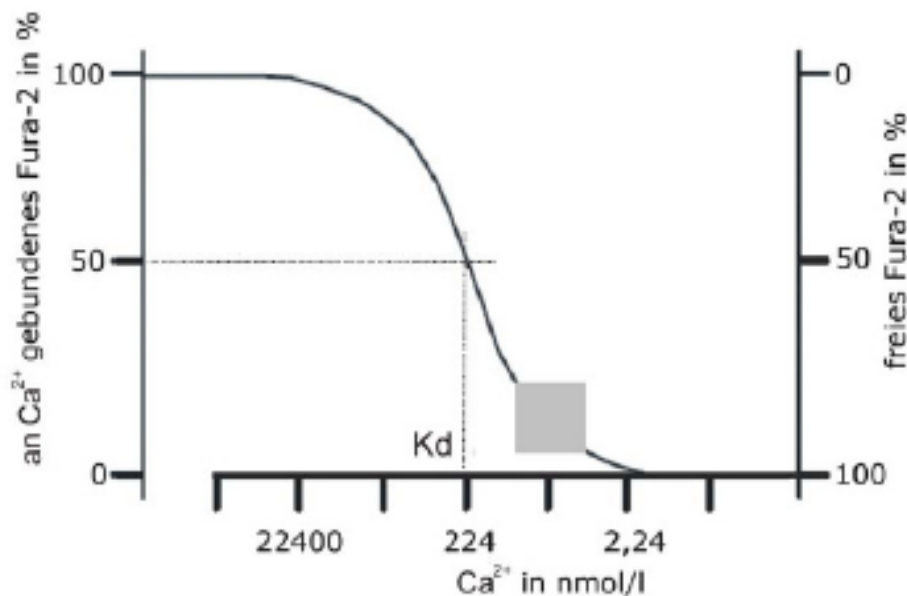


Abb. 6-10: Bindung von Calcium an den Fluoreszenzindikator Fura-2 in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration.

Das graue Quadrat zeigt den Bereich, in dem die cytosolische Calcium-Konzentration unter Ruhebedingungen liegt. K_d = Dissoziationskonstante.

6. Methoden

6.5.3. Der Calcium-Imaging-Messtand

Die Fura-2-Messungen wurden mit einem inversen Lichtmikroskop IX 50 von Olympus (Olympus Optical, Tokyo, Japan) durchgeführt, welches mit einem Epifluoreszenz-Setup und einer Imageanalyse-Software (Till-Photonics, Martinsried, Deutschland) ausgestattet war. Als Lichtquelle diente eine Xenonlampe. Die erzeugten Lichtwellen wurden über einen Spiegel in den Lichtleiter gelenkt. Über einen dichromatischen Spiegel wurde das Anregungslicht auf das Objekt geleitet. Durch Anregung des Farbstoffs mit Licht der Wellenlänge 340 bzw. 380 nm wurde eine Emission bei 510 nm erzeugt, die den dichromatischen Spiegel passieren konnte. Das emittierte Licht wurde von einer CCD-Kamera (charge coupled device; Till Photonics, Martinsried, Deutschland) aufgenommen und an einen Computer gesendet. So konnten während der Versuche fortlaufend Veränderungen der cytosolischen Calcium-Konzentration in Form von sog. „live displays“ aufgezeichnet werden. Durch einen beweglichen Spiegel konnte das Licht alternativ zum Auge oder zur Kamera weitergeleitet werden. Abb. 6-11 zeigt den Aufbau des Fura-2-Messtands.

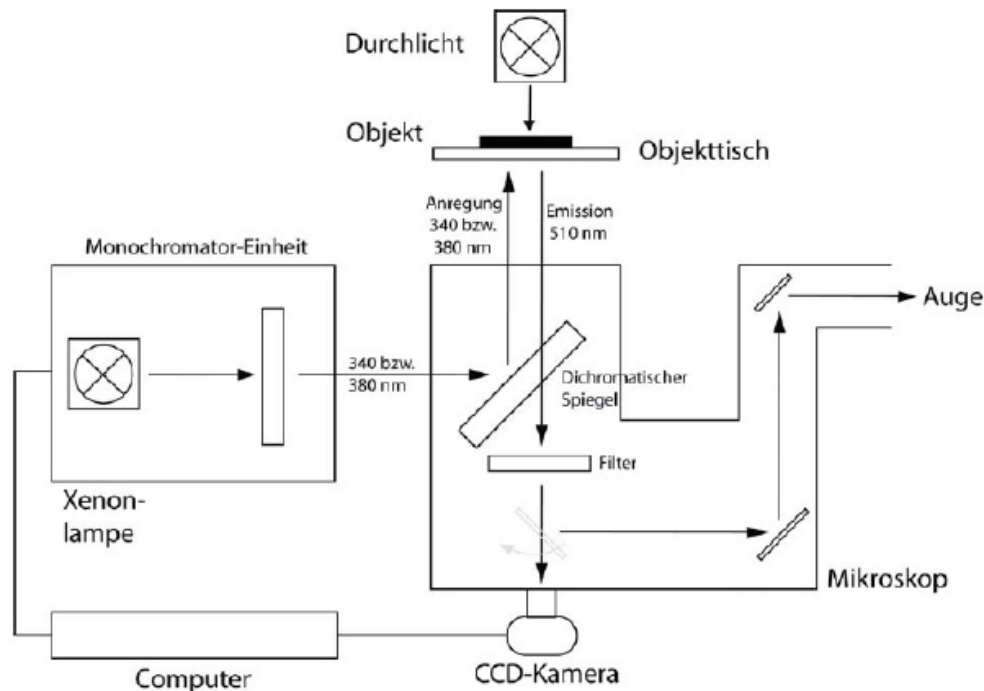


Abb.6-11: Aufbau des Calcium-Imaging-Messtands

6. Methoden

6.5.4. Die Imaging-Messkammer mit Perfusionssystem

Die Messkammer bestand aus einer Metallplatte mit einer kreisrunden, im Durchmesser 1,0 cm großen Aussparung in der Mitte, auf die das Glasplättchen mit dem Gewebestück aufgelegt werden konnte. Zur Befestigung des Glasplättchens wurde ein Teflon-Ring mit gleicher Öffnung auf die Metallplatte aufgesteckt und mit vier Schrauben flüssigkeitsdicht fixiert. Durch die Form des Teflon-Rings konnte oberhalb des Glasplättchens bis zu 2 ml Flüssigkeit zugegeben werden. Die gesamte Vorrichtung wurde nun auf dem Objektisch fixiert und an ein Perfusionssystem angeschlossen. Die ständige Perfusion mit frischer Tyrodelösung erfolgte durch einen mittels einer Schlauchpumpe gesteuerten Zu- und Ablauf über Kanülen und Schläuche. Zu- und Ablaufkanülen wurden hierfür jeweils gegenüberliegend an ca. 2 cm hohen Teflon-Pins befestigt. Somit konnte das Flüssigkeitsvolumen in der Kammer auch während der Perfusion konstant gehalten werden. Die Geschwindigkeit der Perfusion wurde auf 250 ml/h eingestellt. Alle Imaging-Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

6.5.5. Calcium-Imaging-Experimente an kultivierten HT29/B6-Zellen

Die Mehrheit der Calcium-Imaging-Versuche wurde an kultivierten HT29/B6-Zellen durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen mit Fura-2 beladen. Dazu wurden die Zellen mit Fura-2 AM (6 $\mu\text{mol/l}$) und 0,5 g/l Pluronic acid für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (siehe 5.6.6.). Um den nicht aufgenommenen Farbstoff zu entfernen, folgten bei den Zellen drei Waschschrte mit Tyrode. Die Inkubation mit Fura-2 sowie alle folgenden Schritte fanden unter Lichtschutz statt.

Die Lösung auf den Glasplättchen, auf denen sich die aufgeladenen HT29/B6-Zellen befanden, wurde mittels Pipette abgesaugt und die Plättchen anschließend in die Messkammer eingespannt und auf dem Objektisch befestigt. Durch ein 20 \times Objektiv wurde bei Durchlicht nach geeigneten Zellen gesucht und diese dann entsprechend justiert. Davon wurde mit Hilfe der Imaging-Software ein so genannter „Snapshot“ erstellt, der auf dem Bildschirm als Falschfarbendarstellung zu sehen war. Geringere Fluoreszenzintensität wurde mit der Farbe Blau, stärkere mit Grün bis Gelb bis hin zu Rot dargestellt (Abb. 6-12).

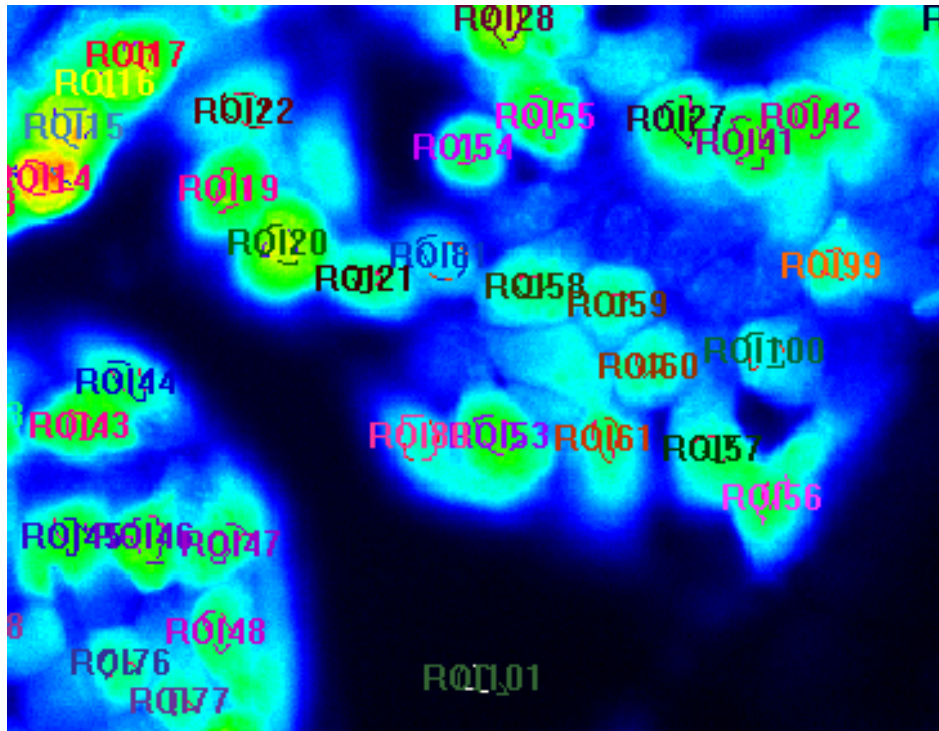


Abb. 6-12: Fura-2 AM beladene HT29/B6-Zellen nach der Markierung

Anhand dieser Darstellung wurden für jede Zellen manuell als Messbereich (ROI = region of interest) festgelegt. Ein „ROI“ außerhalb der Zellen diente als Leerwertmessbereich.

6.5.6. Datenerfassung

Zur Datenerfassung und zur Steuerung des Versuchsablaufs wurde die Imaginganalyse-Software TILLvisION verwendet. Das Protokoll legte fest, dass alle 5 Sekunden eine Belichtung mit beiden Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm) vorgenommen und jeweils die Emission aufgezeichnet wurde. Die Belichtungsdauer betrug jeweils 20 ms. Während des gesamten Versuchs konnten die emittierten Fluoreszenzsignale am Computerbildschirm verfolgt werden. Das Programm errechnete zudem gleichzeitig die Ratio aus der Emission bei beiden Anregungswellenlängen, sodass die Wirkung einer Substanzzugabe auf die cytosolische Calcium-Konzentration direkt beobachtet werden konnte. Stieg die Calcium-Konzentration an, stieg auch das Ratio-Signal, umgekehrt sank das Signal ab, wenn die Calcium-Konzentration geringer wurde. Alle erfassten Werte wurden gespeichert und danach mit verschiedenen Datenanalyse-Programmen ausgewertet.

6. Methoden

6.6. siRNA- Experimente mit HT29/B6-Zellen

6.6.1. Theorie der siRNA-Transfektion

Transfektion ist ein Prozess, bei dem Fremd-DNA oder RNA in eukaryotische Zellen eingebracht werden (Spizizen et al. 1966). Dafür muss die negative Ladung der Nukleinsäuren neutralisiert oder in eine positive umgekehrt werden. Chemikalien wie Calciumphosphat und DEAE-Dextran oder kationische Lipid-Reagentien wie Lipofectamine können die negativ geladene Oberfläche bedecken und damit die negativen Ladungen neutralisieren oder die Ladung sogar manchmal auch ins Positive umkehren (Abb. 6-13). Diese Transfektionsmittel erleichtern also die Passage durch die Zellmembran.

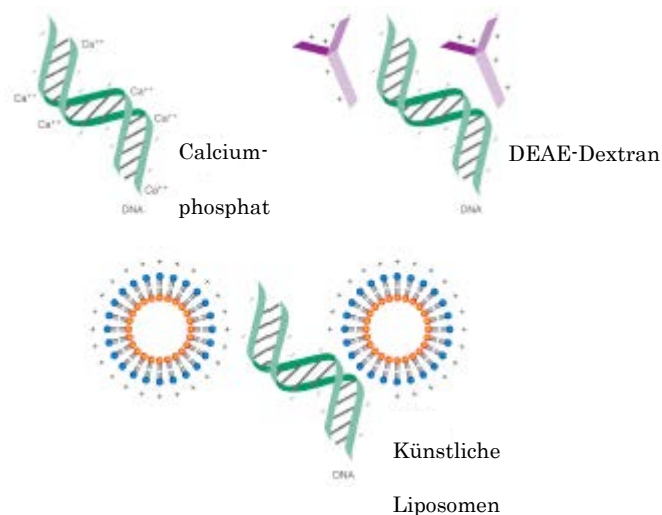


Abb. 6-13: Verschiedene Transfektionsmittel.

Aus: <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection/>.

Kationische Lipide (Abb. 6-14) wurden erstmals 1980 als Transfektionsmittel verwendet (Fraley et al. 1980)

6. Methoden

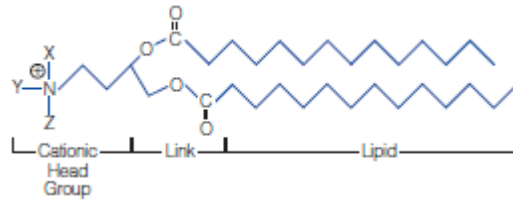


Abb. 6-14: Allgemeine Struktur eines kationischen Lipids

Kationische Lipid-Reagenzien bilden, wenn sie unter optimalen Konditionen in Wasser vorliegen, kleine (ungefähre Größe: 100 bis 400 nm) unilamelläre Liposomen. Die Oberfläche dieser Liposomen ist positiv geladen und damit dazu in der Lage die negativ geladene Plasmid-DNA zu binden. Es bilden sich größere Komplexe, die von den Zielzellen aufgenommen werden (Gareis et al. 1991; Gershon et al. 1993; Smith et al. 1993). Die DNA-Liposomen-Komplexe werden dann in Form von Endosomen und Lysosomen in die Zellen aufgenommen (Coonrod et al. 1997).

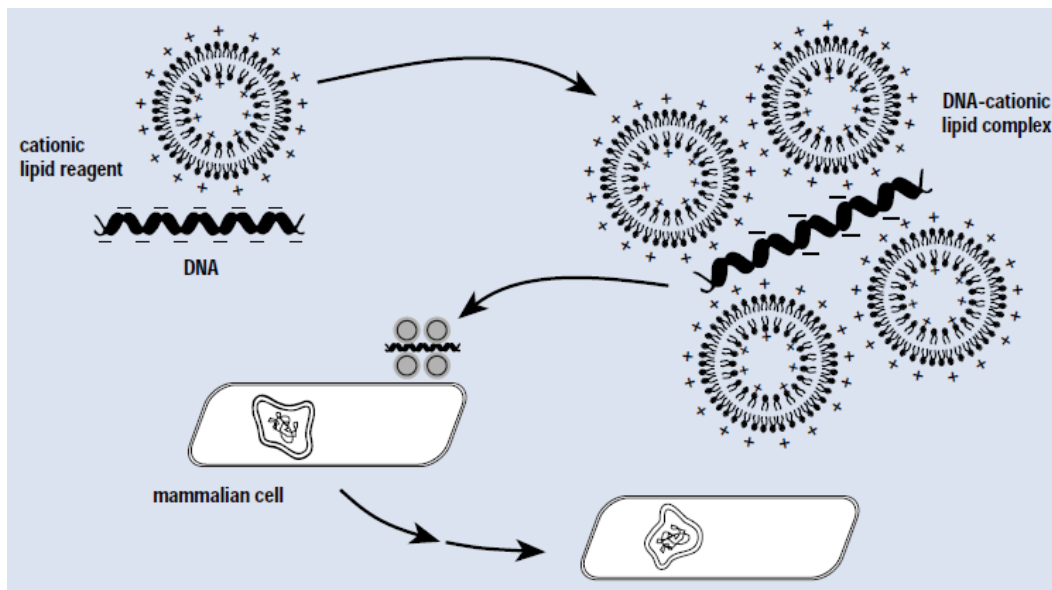


Abb. 6-15: Cationic lipid reagent-mediated transfection (Lipofectamine).

Aus: <http://www.invitrogen.jp/products/pdf/transgd.pdf>.

6. Methoden

6.6.2. Theorie der Hemmung der Translation durch siRNAs

Die siRNA (small interference RNA) besteht aus einem etwa 19 bis 23 Basenpaare (bp) umfassenden doppelsträngigen Kern mit jeweils zwei endständig überstehenden Nukleotiden (de Fougères et al. 2007). Das 5'-Ende jedes Strangs ist phosphoryliert, während die 3'-Enden freie Hydroxylgruppen tragen (de Fougères et al. 2007).

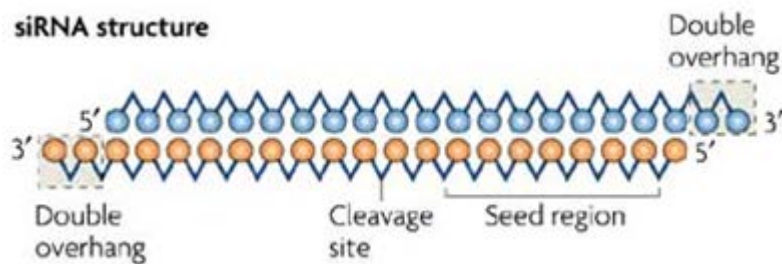


Abb. 6-16: Struktur der siRNA.

Aus (de Fougères et al. 2007)

Die siRNA spielt eine wichtige Rolle bei der RNA-Interferenz (kurz RNAi oder auch RNA-Silencing). RNAi wurde von Fire et al. im Jahr 1998 entdeckt (Fire et al. 1998). Die RNA-Interferenz ist ein natürlicher und evolutionär konservierter Mechanismus in Eukaryoten (Rassouli, Matin 2009; Cerutti, Casas-Mollano 2006), der sich als eine experimentelle Möglichkeit zur Stilllegung von Genen („Gen-Knockdown“) etabliert hat.

Zunächst werden lange doppelsträngige RNAs (dsRNAs = double-stranded RNA) gebildet und von einer RNaseIII-like Endonuclease, dem Dicer, zu siRNAs gespalten (Bernstein et al. 2001; Meister, Tuschl 2004; Sontheimer 2005; Tomari 2005) (siehe auch Abb. 6-17 A, B und C). Dann binden diese kleinen doppelsträngigen siRNAs an einen Multiprotein-Komplex, den sogenannten RNA-induced silencing complex (RISC) (Pham et al. 2004; Tomari et al. 2004). Die Kern-Komponente von RISC gehört zur Argonaute-Piwi (Ago-Piwi) Familie, aus der einige Polypeptide die Funktion von siRNA-gesteuerten Endonucleasen aufweisen (Hammond 2001; Liu et al. 2004; Meister, Tuschl 2004; Baumberger 2005; Tomari 2005).

Nach der Bindung der doppelsträngigen siRNA an RISC schneidet das Enzym Ago einen Strang der siRNA (passenger strand) ab (Matranga et al. 2005). Dies verursacht die Trennung der siRNAs aus dem RISC (Miyoshi et al. 2005; Rand et al. 2005). Normalerweise schneidet die Endonuclease Ago2 die Ziel-mRNA in perfekter Übereinstimmung mit der

6. Methoden

siRNA ab, während miRNA (micro-RNA) in unvollkommener Überstimmung mit ihrem Ziel die Degradation von mRNA einleitet und die Translation verhindert.

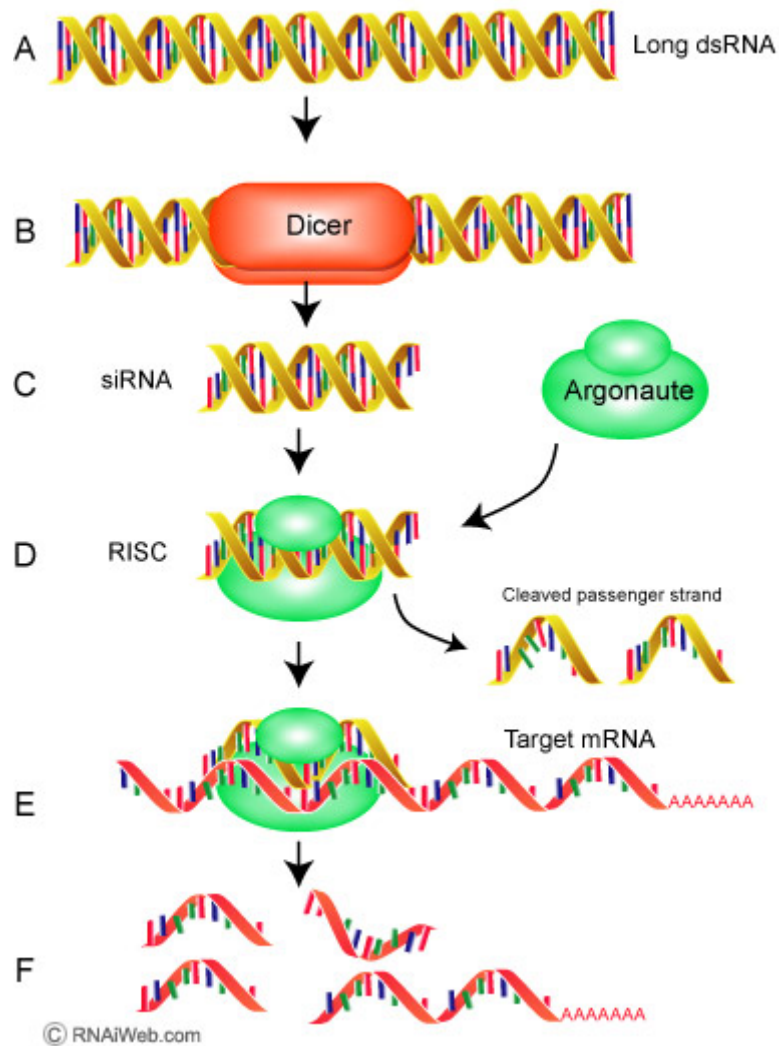


Abb. 6-17: Mechanismus der RNAi.

Aus http://www.rnaiweb.com/RNAi/What_is_RNAi/

A: lange dsRNA.

B: Die RNase III Dicer schneidet dsRNA heraus.

C: siRNA aus 19-23 Nukleotiden.

D: Durch Anlagerung von Argonaute (Ago) entsteht RISC.

E und F: RISC erkennt die Ziel-mRNA und spaltet sie – die Translation wird verhindert.

6. Methoden

Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Mittelwerten \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM) oder in Originalkurven. Wurden die Ergebnisse in Form von Messbalken abgebildet, stellt die Höhe der Säule den Mittelwert dar, der Fehlerbalken den SEM. Bei den Calcium-Imaging-Versuchen bezeichnet n die Anzahl der einzelnen gemessenen Epithelzellen. Bei Ussingkammer- und Immunfluoreszenz-Messungen steht n für die Anzahl der verwendeten Gewebe. Unabhängig davon wurden die Zellen oder Gewebe für alle Versuche jeweils aus mindestens zwei verschiedenen Tieren gewonnen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde entweder ein Student's t-Test oder ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein F-Test legte fest, welche dieser beiden Methoden angewendet wurde. Um mehrere verschiedene Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde ein anschließender Post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mit der Statistik Software StatMost™ 32 (Dataxiom, Los Angeles, Kalifornien, USA).

7. Ergebnisse

7.1. Expression von STIM- und Orai-Proteinen

Um herauszufinden, ob in den Kolonepithelzellen der Ratten STIM-Proteine (STIM1 und STIM2) und Orai-Proteine (Orai1, Orai2 sowie Orai3), die als Ca^{2+} -Sensor beziehungsweise als Teilstruktur von Calciumkanälen fungieren, existieren oder nicht, wurden immunohistochemische Experimente mit Antikörpern gegen diese Proteine durchgeführt. Expression von STIM1 wurde im gesamten Kolonepithel beobachtet. Es gab keine nennenswerten Gradienten hinsichtlich der STIM1-Immunoreaktivität entlang der Oberflächen-Krypten-Achse, d.h. STIM1 wird sowohl von unreifen Funduszellen wie auch von reifen Oberflächenepithelzellen exprimiert (Abb. 7-1). Neben der Expression in Epithelzellen, deren Verlauf entlang der Krypten relativ gut anhand der durch DAPI gefärbten Zellkerne erkennbar ist, war auch in Zellen in der Lamina propria zwischen einzelnen Krypten ein immunhistochemisches Signal zu beobachten. In Muskelzellen der Lamina muscularis propria war ebenfalls eine STIM1-Immunoreaktivität zu beobachten. Die Negativkontrollen, bei denen der Primärantikörper gegen STIM1 weggelassen wurde, zeigten kein Signal, was eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers ausschließt.

Eine ähnliche Verteilung im Bereich der Mucosa wies STIM2 auf, welches ebenfalls im Kolonepithel entlang der Krypten-Oberflächen-Achse zu finden war (Abb. 7-2). Im Unterschied zu STIM2 war aber eine Markierung der glatten Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae und der Lamina muscularis propria zu beobachten. Bei Weglassen des Primärantikörpers gegen STIM2 (Negativkontrolle) war kein Fluoreszenzsignal zu sehen.

Ähnliche Muster ergaben sich auch für die drei untersuchten Orai-Proteine. Sowohl Orai1 (Abb. 7-3) als auch Orai2 (Abb. 7-4) sowie Orai3 (Abb. 7-5) ließen sich im Kolonepithel darstellen. Eine Immunoreaktivität für Orai1, Orai2 sowie Orai3 war auch in der glatten Muskulatur der Lamina muscularis mucosae und der Lamina muscularis propria zu finden. Die Negativkontrollen zeigten keine Färbung mit Ausnahme der Experimente zur Darstellung der Verteilung von Orai3, die eine leichte, diffuse Hintergrundfärbung aufwiesen.

7. Ergebnisse

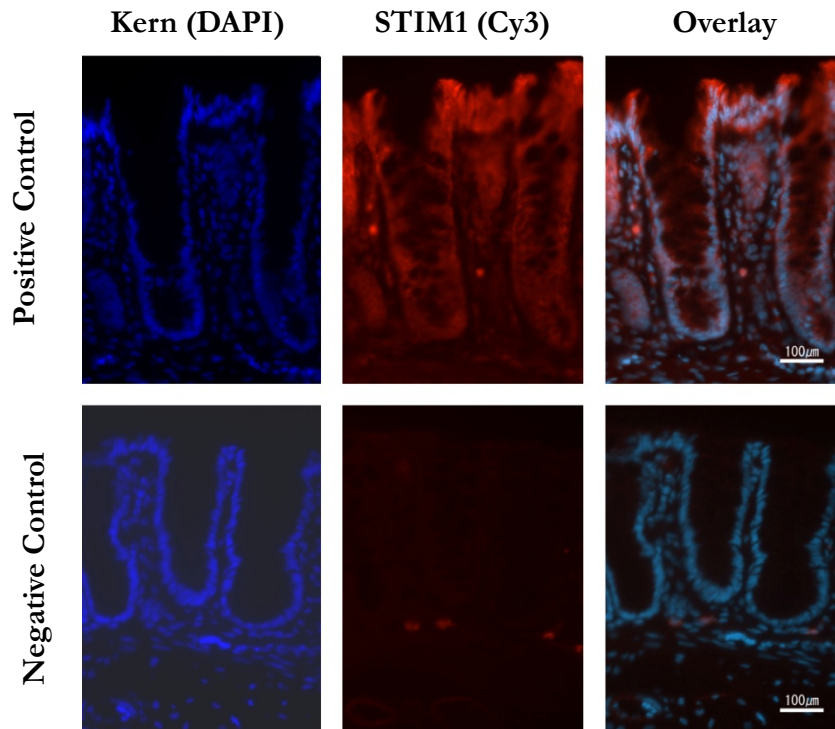


Abb. 7-1: Immunohistochemische Detektion von STIM1 im Kolon der Ratte.

Die Bilder sind derart angeordnet, dass das Oberflächenepithel im oberen Bildteil und die Submukosa im unteren Bildteil dargestellt wird. Linke Spalte: Kernfärbung mit DAPI (blau); mittlere Spalte: immunohistochemisches Signal (Cy3-markiert, rot); rechte Spalte: Überlagerung beider Signale. Die erste Zeile zeigt die Färbung in Gegenwart (positive control), die zweite Zeile in Abwesenheit (negative control) des Primärantikörpers gegen STIM1. Die Skalen (100 μm) sind gültig für alle Bilder. Typische Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

7. Ergebnisse

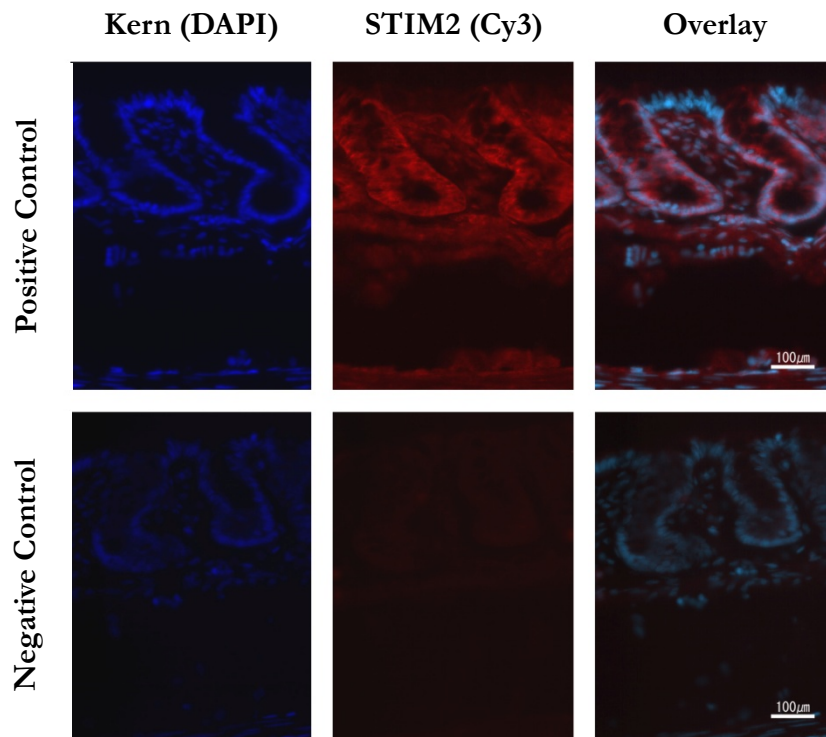


Abb. 7-2: Immunohistochemische Detektion von STIM2 im Kolon der Ratte.

Die Bilder sind derart angeordnet, dass das Oberflächenepithel im oberen Bildteil und Submucosa/Muscularis propria im unteren Bildteil dargestellt wird. Linke Spalte: Kernfärbung mit DAPI (blau); mittlere Spalte: immunohistochemisches Signal (Cy3-markiert, rot); rechte Spalte: Überlagerung beider Signale. Die erste Zeile zeigt die Färbung in Gegenwart (positive control), die zweite Zeile in Abwesenheit (negative control) des Primärantikörpers gegen STIM2. Die Skalen (100 µm) sind gültig für alle Bilder. Typische Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

7. Ergebnisse

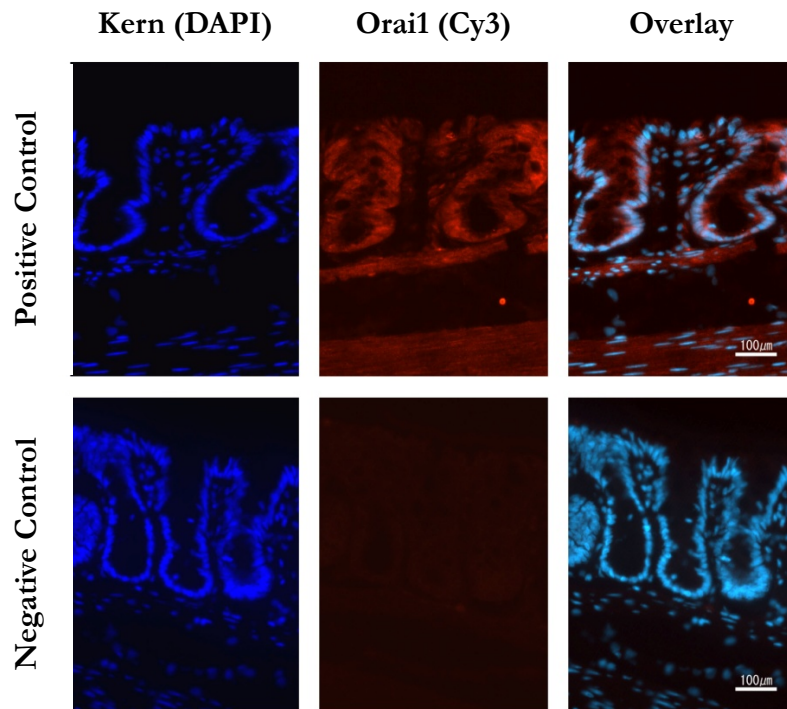


Abb. 7-3: Immunohistochemische Detektion von Orai1 im Kolon der Ratte.

Die Bilder sind derart angeordnet, dass das Oberflächenepithel im oberen Bildteil und Submucosa/Muscularis propria im unteren Bildteil dargestellt wird. Linke Spalte: Kernfärbung mit DAPI (blau); mittlere Spalte: immunohistochemisches Signal (Cy3-markiert, rot); rechte Spalte: Überlagerung beider Signale. Die erste Zeile zeigt die Färbung in Gegenwart (positive control), die zweite Zeile in Abwesenheit (negative control) des Primärantikörpers gegen Orai1. Die Skalen (100 µm) sind gültig für alle Bilder. Typische Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

7. Ergebnisse

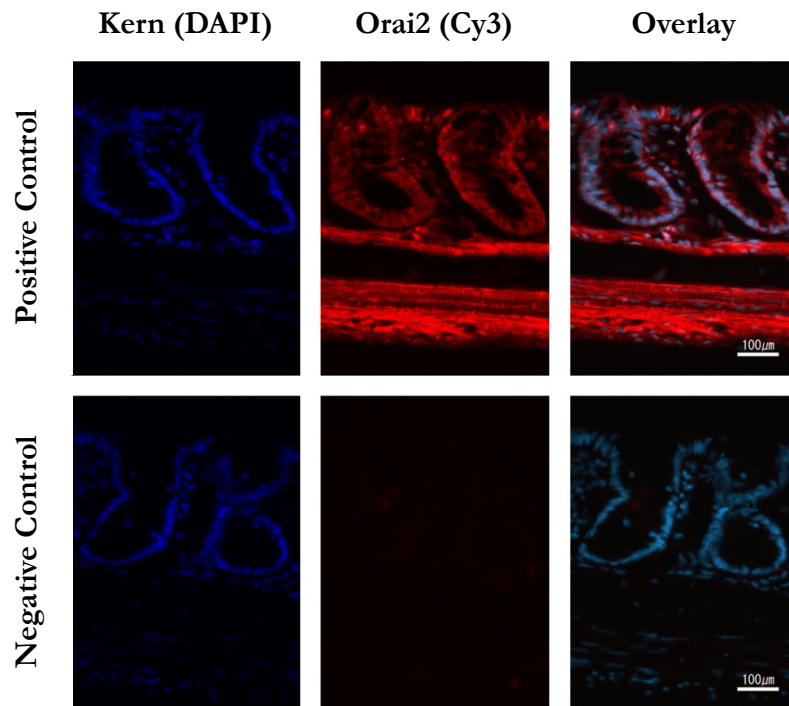


Abb. 7-4: Immunohistochemische Detektion von Orai2 im Kolon der Ratte.

Die Bilder sind derart angeordnet, dass das Oberflächenepithel im oberen Bildteil und Submucosa/Muscularis propria im unteren Bildteil dargestellt wird. Linke Spalte: Kernfärbung mit DAPI (blau); mittlere Spalte: immunohistochemisches Signal (Cy3-markiert, rot); rechte Spalte: Überlagerung beider Signale. Die erste Zeile zeigt die Färbung in Gegenwart (positive control), die zweite Zeile in Abwesenheit (negative control) des Primärantikörpers gegen Orai2. Die Skalen (100 µm) sind gültig für alle Bilder. Typische Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

7. Ergebnisse

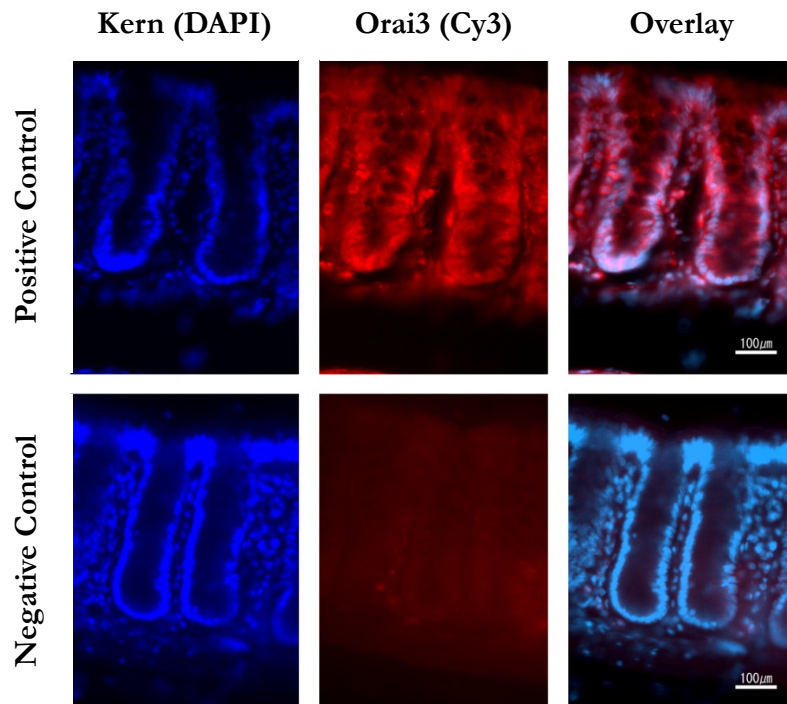


Abb. 7-5: Immunohistochemische Detektion von Orai3 im Kolon der Ratte.

Die Bilder sind derart angeordnet, dass das Oberflächenepithel im oberen Bildteil und Submucosa/Muscularis propria im unteren Bildteil dargestellt wird. Linke Spalte: Kernfärbung mit DAPI (blau); mittlere Spalte: immunohistochemisches Signal (Cy3-markiert, rot); rechte Spalte: Überlagerung beider Signale. Die erste Zeile zeigt die Färbung in Gegenwart (positive control), die zweite Zeile in Abwesenheit (negative control) des Primärantikörpers gegen Orai3. Die Skalen (100 µm) sind gültig für alle Bilder. Typische Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

7. Ergebnisse

7.2. Translokation von STIM1 nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung

Da in anderen Zellsystemen STIM1 und Orai1 als die beiden wichtigsten Vertreter der jeweiligen Proteinfamilie, die am kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom beteiligt sind, angesehen werden (Carrasco, Meyer 2011), wurde in den folgenden Versuchen ein Hauptaugenmerk auf STIM1 und Orai1 gelegt.

Von Lymphozyten, z.B. Jurkat-Zellen, einer T-Lymphozytenzelllinie, ist bekannt, dass STIM1 nach einer Ca^{2+} -Speicher-Entleerung zur Zellmembran wandert (Wu et al. 2006). Um herauszufinden, ob eine ähnliche Translokation am Kolonepithel der Ratte stattfindet und um zu klären, zu welchem Zellpol der polarisierten Epithelzellen das Protein transloziert, wurde die Verteilung von STIM1 nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Zur Entleerung der zellulären Ca^{2+} -Speicher wurde folgendes Protokoll gewählt. Mucosa-Submucosa-Präparate aus dem Rattenkolon wurden für 2 h bei 37 °C in einer calciumfreien Parsons-Lösung (siehe 5.4.7.) inkubiert. Außerdem befand sich Cyclopiazonsäure (10^{-5} mol/l, siehe 5.7.5.) in diesem Puffer, welche durch Hemmung der Sarcoplasmatisch-Endoplasmatischen Reticulum- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) die Wiederfüllung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher verhindert (Plenge-Tellechea et al. 1997). Die entsprechenden Kontrollgewebe wurden für 2 Stunden in Ca^{2+} -haltiger Parsons-Lösung (siehe 5.4.7.) ohne Cyclopiazonsäure inkubiert.

Unter Kontrollbedingungen wurde die STIM1-Immunofluoreszenz – ähnlich wie in den initial durchgeführten Experimenten an frisch entnommenen Darmpräparaten (Abb. 7-1) – mehr oder weniger homogen verteilt in den Epithelzellen gefunden (siehe Abb. 7-6, links). Die in-vitro Inkubation über 2 h alleine hatte also keinen Effekt auf die Verteilung des Proteins. Dies änderte sich drastisch nach der Ca^{2+} -Speicher-Entleerung. Nach 2 h Inkubation in Ca^{2+} -freier Parsons-Lösung in Kombination mit SERCA-Blockade war eine Kondensation der Immunofluoreszenz von STIM1 an der basalen Seite des Zellpols (markiert mit dem weißen Pfeil in Abb. 7-6) und in den lateralen Zellgrenzen zu beobachten. Das war nicht unerwartet, weil die Antwort auf Ca^{2+} -abhängige Sekretagoge von der Anwesenheit von Ca^{2+} im serosalen Puffermedium abhängt (Zimmerman et al. 1983). Eine Translokation von STIM1 nahe zur basolateralen Membran wäre gut vereinbar mit der Modellvorstellung, dass darüber nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung Ca^{2+} -Kanäle in der basolateralen Membran zur Wiederauffüllung der Speicher, sprich zum kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom, aktiviert werden. Daneben wurde aber auch eine Translokation von STIM1

7. Ergebnisse

an den apikalen Zellpol beobachtet (markiert mit dem blauen Pfeil in Abb. 7-6). Die Kondensation von STIM1 am apikalen Zellpol fiel in einigen Kryptenbereichen sogar qualitativ deutlich prominenter aus als diejenige am basalen Zellpol.

Um diese Translokation zu quantifizieren, wurde eine morphometrische Analyse der STIM1-Immunofluoreszenz durchgeführt. Für diesen Zweck wurde eine Linie parallel zur Längsachse der einzelnen Epithelzellen gezeichnet (siehe rote Linie in Abb. 7-6 als Beispiel). Die gesamte Fluoreszenzintensität, die entlang dieser Längsachse gefunden wurde, wurde als 100 % gesetzt und die Verteilung des STIM1-Signals entlang dieser Achse prozentual dargestellt (Abb. 7-7). Man erkennt deutlich eine Zunahme des Anteils der STIM1-Fluoreszenz nahe dem basalen und – stärker noch – nahe dem apikalen Zellpol nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung (Abb. 7-7, B) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 7-7, A).

Um die unterschiedlichen Größen der einzelnen untersuchten Zellen zu kompensieren, wurde für die X-Achse bei dieser Darstellung der basale Zellpol als 0 % Zellhöhe gesetzt und der apikale Zellpol als 100 % Zellhöhe (siehe Schema in der Abb. 7-7). Wenn die Fluoreszenz in den fünf direkt an den basalen Zellpol angrenzenden Kompartimenten (0 – 5 % der Zellhöhe, das heißt die ersten 5 X-Werte in Abb. 7-7) integriert wurde, stieg die STIM1-Fluoreszenz in diesem basalen Kompartiment von $6,15 \pm 0,14$ ($n = 240$ Zellen) unter Kontrollbedingungen auf $6,90 \pm 0,15$ ($n = 220$ Zellen) nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung an ($P < 0,05$). Wenn die Fluoreszenz in den fünf direkt an den apikalen Zellpol angrenzenden Kompartimenten (95 – 100 % der Zellhöhe, das heißt die letzten 5 X-Werte in Abb. 7-7) integriert wurde, nahm die STIM1-Fluoreszenz von $4,12 \pm 0,08$ ($n = 240$ Zellen) unter Kontrollbedingungen auf $8,64 \pm 0,26$ ($n = 220$ Zellen) nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung zu ($P < 0,05$).

Mit der gleichen Methodik wurde mittels konfokaler Mikroskopie die Verteilung von Orai1 unter Kontrollbedingungen und nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung untersucht (Abb. 7-8). Wenn die Fluoreszenz in den fünf direkt am basalen Zellpol gelegenen Kompartimenten (0 – 5 % der Zellhöhe, das heißt die erste 5 X-Werte in Abb. 7-8) integriert wurde, nahm die Intensität in dieser Region von $4,83 \pm 0,02$ ($n = 240$ Zellen) unter Kontrollbedingungen auf $5,45 \pm 0,03$ ($n = 220$ Zellen) nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung zu ($P < 0,05$). Wenn die Fluoreszenz in den fünf direkt an den apikalen Zellpol angrenzenden Kompartimenten (95 – 100 % der Zellhöhe, das heißt, die

7. Ergebnisse

letzte 5 X-Werte in Abb. 7-8) aufintegriert wurde, stieg die Intensität von $3,81 \pm 0,02$ (n = 240 Zellen) unter Kontroll-Konditionen auf $6,97 \pm 0,05$ (n = 220 Zellen) nach Calcium-Speicher-Entleerung ($P < 0,05$). Diese Verschiebung zum apikalen Zellpol war also bei Orai1 geringer als bei STIM1.

7. Ergebnisse

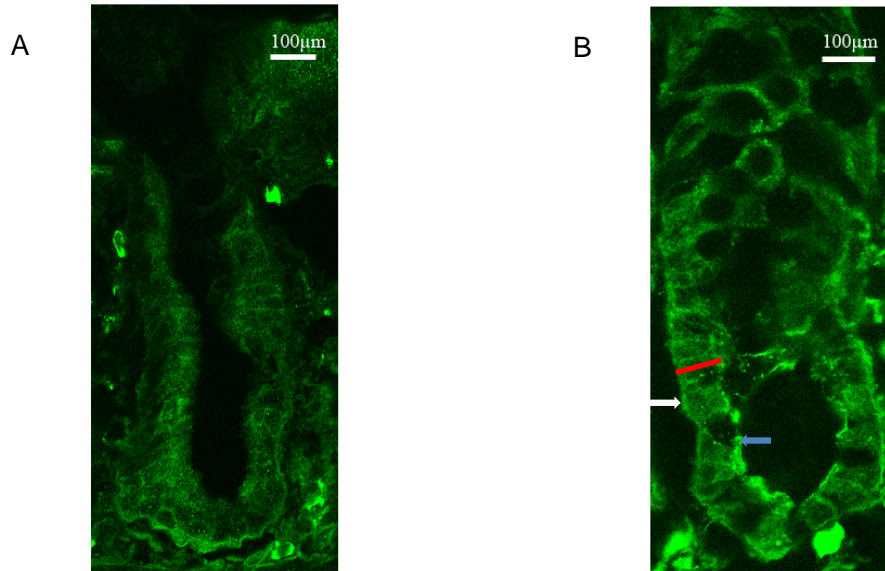


Abb. 7-6: Lokalisation von STIM1 vor und nach Ca²⁺-Speicher-Entleerung.

Die Gewebe wurden entweder für 2 h unter Kontrollbedingungen (Ca²⁺-haltige Parsons-Lösung, A) oder in Ca²⁺-freier Parsons-Lösung kombiniert mit Cyclopiazonsäure (10⁻⁵ mol/l) inkubiert (B) und mittels eines konfokalen Mikroskops untersucht. Basolaterale (weißer Pfeil) und apikale (blauer Pfeil) Zellpole sind markiert. Die rote Linie demonstriert die Art, wie die Verteilung der STIM1-Immunofluoreszenz entlang der Längsachse einzelner Epithelzellen analysiert wurde (siehe Abb. 7-7). Die Bilder sind typische Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Für die Statistik, siehe Abb. 7-7.

7. Ergebnisse

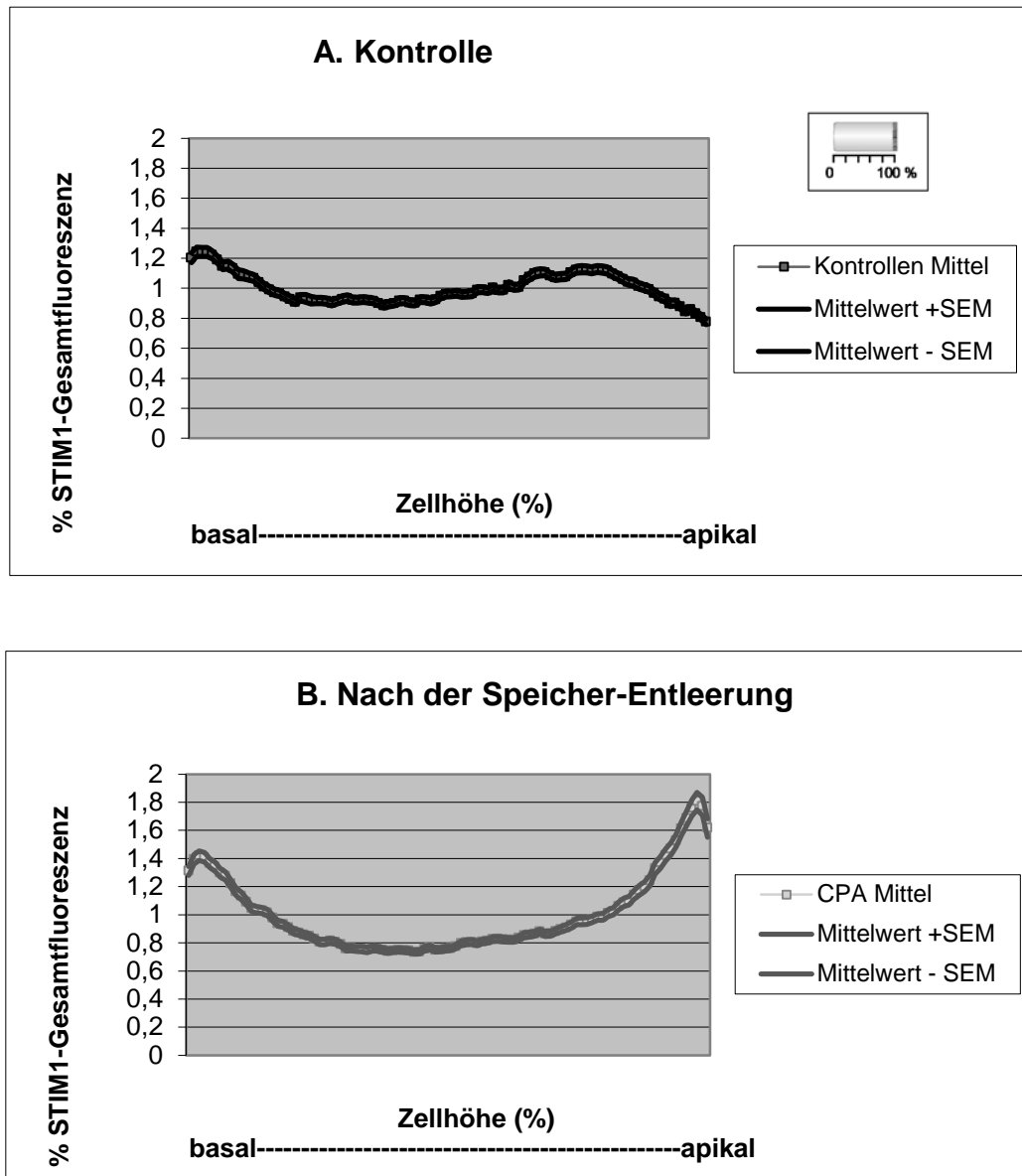


Abb. 7-7: Morphometrische Analyse der Verteilung der STIM1-Immunofluoreszenz entlang der Längsachse von Epithelzellen (siehe rote Linie in Abb. 7-6 als Beispiel).

Das Prinzip der Auswertung ist in dem Schema dargestellt. Für die Y-Achse wurde die Gesamtfluoreszenz, die entlang der longitudinalen Achse gemessen wurde, als 100 % gesetzt. Um die unterschiedliche Höhe einzelner Zellen zu kompensieren wurde für die X-Achse die basale Zellgrenze als 0 % Zellhöhe und die apikale Zellgrenze als 100 % Zellhöhe angesetzt. Die Werte sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (Linien), $n = 220 - 240$ Zellen.

7. Ergebnisse

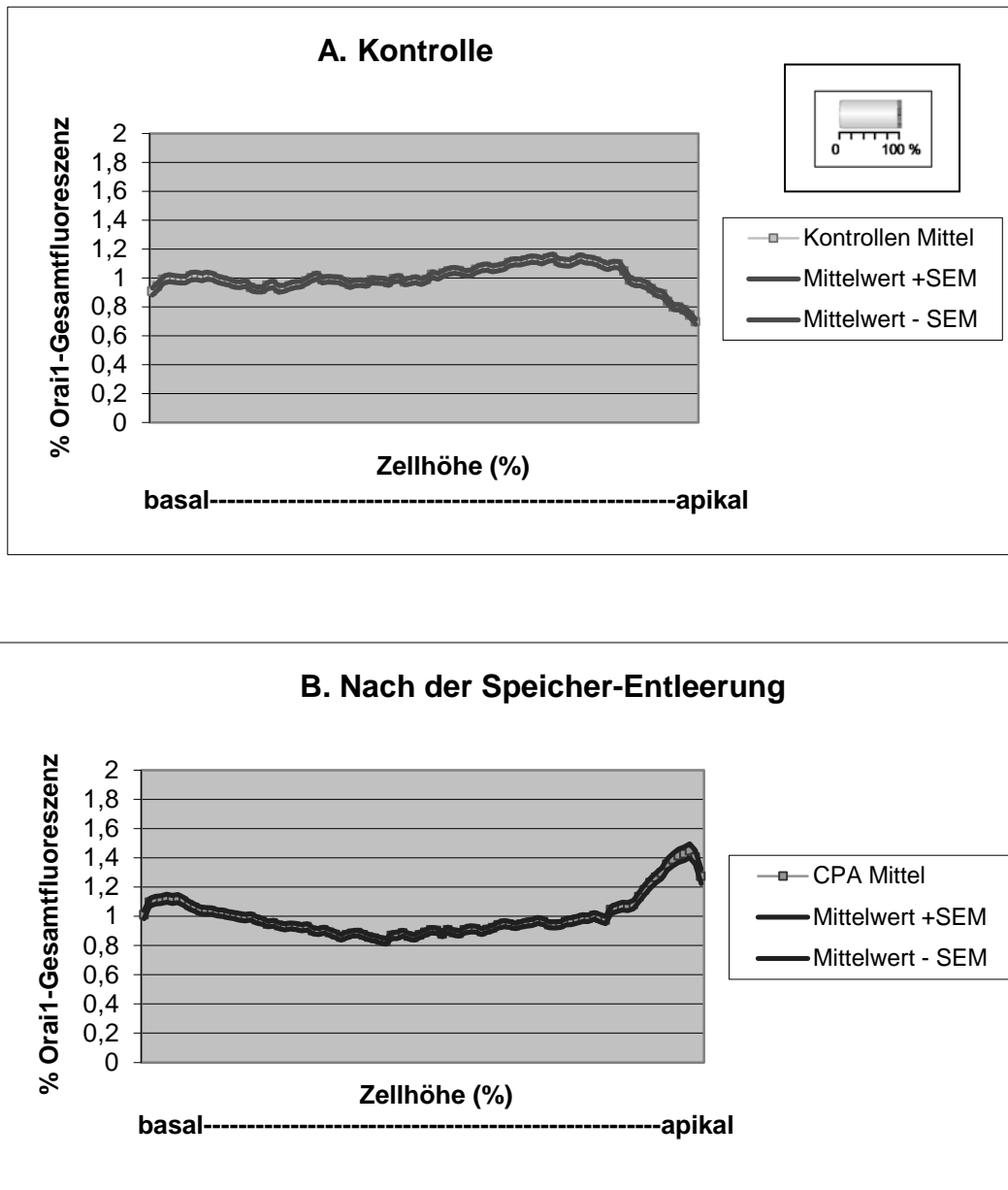


Abb. 7-8: Morphometrische Analyse der Verteilung der Orai1-Immunofluoreszenz entlang der Längsachse von Epithelzellen (siehe rote Linie in Abb. 7-6 als Beispiel).

Für die Y-Achse wurde die Gesamtfluoreszenz, die entlang der longitudinalen Achse gemessen wurde, als 100 % gesetzt. Um die unterschiedliche Höhe einzelner Zellen zu kompensieren wurde für die X-Achse die basale Zellgrenze als 0 % Zellhöhe und die apikale Zellgrenze als 100 % Zellhöhe angesetzt. Die Werte sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (Linien), $n = 220 - 240$ Zellen.

Um ein genaueres Bild über die intrazelluläre Verteilung von STIM1 nach

7. Ergebnisse

Ca^{2+} -Speicher-Entleerung zu erhalten, wurde eine Komarkierung von Aktinfilamenten mit Phalloidin-FITC vorgenommen. Aktinfilamente formen unter anderem das Terminal Web direkt unterhalb der Bürstensaummembran; sie wurden daher als Marker eingesetzt, um die unerwartete Translokation von STIM1 an den apikalen Zellpol näher zu charakterisieren.

Die Phalloidin-FITC-Färbung zeigt eine starke Markierung der apikalen Region der Epithelzellen (durch Markierung des Terminal Webs) sowie der basolateralen Zellgrenzen (Abb. 7-9, links). Die gleichzeitige Färbung von STIM1 (Abb. 7-9, Mitte) und die Übereinanderlagerung beider Signalen (Abb. 7-9, rechts) belegt die Translokation von STIM1 nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung zum basolateralen wie auch zum apikalen Zellpol der Epithelzellen.

7. Ergebnisse



Abb. 7-9: Doppelmarkierung von STIM1 und Aktinfilamenten.

Verteilung der STIM1-Immunofluoreszenz (markiert mit Cy3 in rot, Mitte) in Relation zur Verteilung von Aktinfilamenten (markiert mit Phalloidin-FITC in grün, links), und die Überlagerung beider Signale (rechts). Die Gewebe waren für 2 h unter Ca^{2+} -Speicher-entleerenden Bedingungen (Ca^{2+} -freie Parsons-Lösung mit 10^{-5} mol/l Cyclopiazonsäure) inkubiert. Die Skala (10 μm) ist gültig für alle Bilder. Die Bilder sind typische Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

7. Ergebnisse

7.3. Apikaler gegen basolateraler Ca^{2+} -Einstrom:

Ussingkammer-Experimente

Die beobachtete Translokation von STIM1, des mutmaßlichen Ca^{2+} -Sensors des endoplasmatischen Reticulums, sowohl in Richtung der basolateralen wie auch der apikalen Membran deutet an, dass eine Ca^{2+} -Speicher-Entleerung sowohl der Trigger für einen Ca^{2+} -Einstrom durch die basolaterale wie auch durch die apikale Zellmembran sein könnte. Um dieses Hypothese zu überprüfen, wurde ein Ca^{2+} -Entleerung-Wiederfüllung-Protokoll in Ussingkammer-Versuchen durchgeführt. Eine Öffnung von speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanälen führt zur Zunahme der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Kurosaki, Baba 2010). Ein Anstieg der Konzentration dieses second messengers im Cytosol führt über das Öffnen von Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanälen zu einer Hyperpolarisation der basolateralen Zellmembran (Böhme et al. 1991). Diese fördert die Antriebskraft für den Cl^{-} Ausstrom durch apikale Cl^{-} Kanäle, die in der Hauptsache cAMP-regulierte Anionenkanäle vom Typ CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) darstellen und löst damit quasi indirekt eine Cl^{-} Sekretion aus, die sich in Ussingkammerexperimenten als Anstieg des Kurzschlussstroms (Isc) messen lässt (Strabel, Diener 1995).

Um eine Cl^{-} Sekretion als „Read-Out“ für den Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} Konzentration nach Aktivierung speichergesteuerter Ca^{2+} -Kanäle zu nutzen, wurde folgendes Versuchsprotokoll entwickelt. Das gesamte Experiment wurden in der nominalen Abwesenheit von serosalem Ca^{2+} durchgeführt, um eine Ca^{2+} -Speicher-Entleerung zu erreichen. Die Gewebe wurden mit Forskolin ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/l mucosal und serosal, siehe 5.7.6.) vorbehandelt, einer Substanz, die Adenylatcyclasen aktiviert. Durch den Anstieg der cytosolischen cAMP-Konzentration kommt es zu einer Proteinkinase A-vermittelten Phosphorylierung des CFTR-Kanals und damit zu einem Anstieg seiner Offenwahrscheinlichkeit, was eine Cl^{-} Sekretion auslöst (Riordan et al. 1989; Anderson et al. 1991; Berger et al. 1991). Die Ca^{2+} -Speicher-Entleerung wurde weiter unterstützt durch Zugabe des SERCA-Blockers Thapsigargin (10^{-6} mol/l mucosal und serosal, siehe 5.7.10.), um die Wiederauffüllung von Ca^{2+} -Speichern zu unterdrücken. Anschließend wurde kumulativ Ca^{2+} wieder dem serosalen Medium zugesetzt. Diese Ca^{2+} -Wiederfüllung führte zu einem konzentrationsabhängigen, transienten Anstieg des Isc (Abb. 7-10).

Nach der Stimulation einer Cl^{-} -Sekretion durch Forskolin, welches den Isc um $3,94 \pm$

7. Ergebnisse

0,88 $\mu\text{Eq/h/cm}^2$ gegenüber der Baseline anstiegen ließ ($n = 6$, Abb. 7-10), wurden Ca^{2+} -Speicher durch den SERCA-Blocker Thapsigargin entleert. Thapsigargin (10^{-6} mol/l serosal) löste eine weitere Zunahme des Isc um $0,33 \pm 0,20$ $\mu\text{Eq/h/cm}^2$ aus. Wenn danach Ca^{2+} auf der serosalen Seite kumulativ wieder zugesetzt wurde, wurde eine transiente und konzentrationsabhängige Zunahme des Isc beobachtet. Die Zunahme erreichte ein Maximum bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 2,5 - 5 mmol/l (Abb. 7-10A). Wenn ein ähnliches Ca^{2+} -Speicher-Wiederfüllungsprotokoll verwendet wurde, bei dem aber Ca^{2+} auf der mucosalen Seite zugesetzt wurde, zeigte das Gewebe eine geringere Sensitivität gegen Calciumionen im Vergleich zu serosalem Ca^{2+} . Eine maximale Zunahme des Isc wurde erst bei 10 mmol/l Ca^{2+} beobachtet und die Zunahme des Isc betrug nur etwa 25 % der maximalen Antwort auf serosales Ca^{2+} (Abb. 7-10B). Dies bedeutet, dass ein für die Auslösung einer Anionensekretion relevanter Ca^{2+} -Einstrom über die apikale Membran nur bei einer erhöhten chemischen Antriebskraft (erhöhte Ca^{2+} -Konzentration mucosal) stattfindet (siehe Diskussion).

Um annähernd gleich starke sekretorische Antworten hervorzurufen, wurde für die folgenden Versuche eine Ca^{2+} -Konzentration von 1,25 mmol/l für die serosale und von 12,5 mmol/l für die mucosale Ca^{2+} -Repletion gewählt. Der kapazitative Ca^{2+} -Einstrom am Kolonepithel der Ratte erfolgt wahrscheinlich über nichtselektive, Lanthan-sensitive Kationenkanäle (Frings et al. 1999). Es wurde folglich geprüft, ob die sekretorische Antwort, die eine Ca^{2+} -Speicher-Wiederfüllung verursacht, durch Lanthan (serosale und mucosale Seite, siehe auch 5.7.8.) blockiert wird. Die Zugabe von Ca^{2+} (1,25 mmol/l) auf der serosalen Seite verursachte eine Zunahme des Isc von $2,10 \pm 0,36$ $\mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 6$; Abb. 7-11, A). Zugabe von La^{3+} (10^{-3} mol/l auf der serosalen Seite) führte nach einem paradoxen Anstieg des Isc zu einem Abfall des durch Forskolin-stimulierten Isc (Abb. 7-11, B). Nach Vorbehandlung mit La^{3+} war der Ca^{2+} -induzierte Strom signifikant ($P < 0,05$) vermindert und betrug lediglich $0,19 \pm 0,077$ $\mu\text{Eq/h/cm}^2$ (Abb. 7-11, B).

Mit einem ähnlichen Protokoll wurde die Lanthan-Sensitivität des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms über die apikale Membran getestet. Die mucosale Zugabe von Ca^{2+} (12,5 mmol/l) induzierte eine Zunahme im Isc von $2,43 \pm 1,73$ $\mu\text{Eq/h/cm}^2$ unter Kontrollbedingungen ($n = 6$; Abb. 7-11, C). Diese sekretorische Antwort wurde komplett unterdrückt, wenn die Gewebe vorher mit La^{3+} (10^{-3} mol/l) auf der mucosalen Seite vorbehandelt wurden. Unter diesen Bedingungen war nach Zugabe von mucosalem Ca^{2+}

7. Ergebnisse

lediglich eine leichter Abfall des Isc von $-0,27 \pm 0,099 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 5$, $P < 0,05$ gegenüber der Antwort zu Calcium in die Abwesenheit von La^{3+}) zu beobachten (Abb. 7-11, D).

Diese Experimente zeigen, dass es Lanthan-sensitive speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstromwege auch in der apikalen Membran gibt. Ihr quantitativer Beitrag ist aber deutlich geringer als derjenige des Ca^{2+} -Einstroms über die basolaterale Membran, denn nur bei deutlicher Erhöhung der Antriebskraft für den Ca^{2+} -Einstrom (Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf $12,5 \text{ mmol/l}$) lässt sich darüber eine Ca^{2+} -abhängige Cl^- Sekretion erzeugen.

7. Ergebnisse

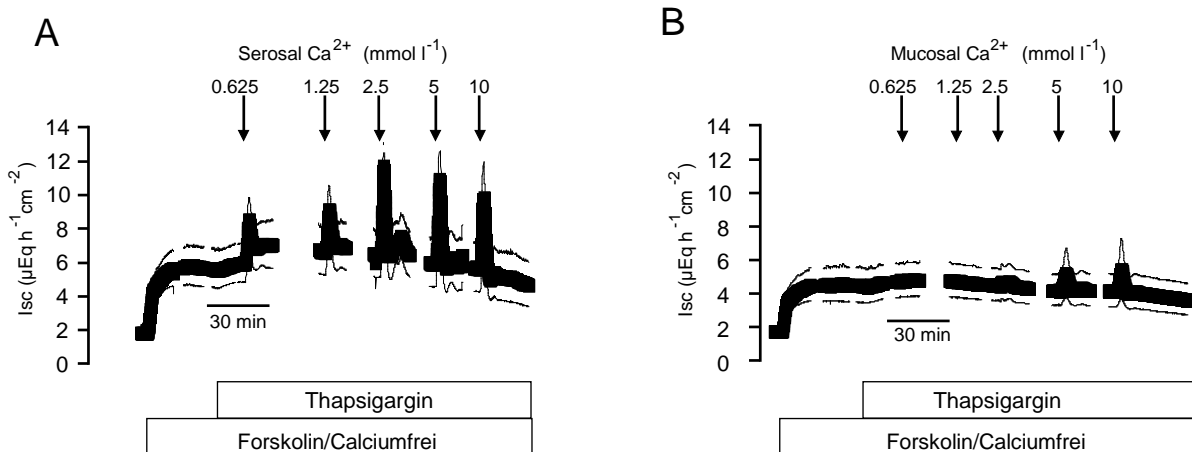


Abb. 7-10: Effekte von Ca^{2+} -Speicher-Entleerung und zunehmender Ca^{2+} -Speicher-Wiederfüllung entweder auf der serosalen (A) oder der mucosalen (B) Seite dem Darmepithels.

Eine Chlorid-Sekretion wurde durch Forskolin ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ mucosal und serosal) induziert, die sarcoplasmatische-endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase wurde mit Thapsigargin gehemmt (10^{-6} mol/l serosal). Die gesamten Experimente wurden in der Abwesenheit von serosalem Ca^{2+} durchgeführt. Die Unterbrechungen der Isc-Kurve kommen durch Weglassen von Zeitintervallen von 5 – 10 min zustande, um die einzelnen Kurven auf die Zugabe der jeweiligen Substanzen zu synchronisieren. Die Werte sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (Linien), $n = 6$.

7. Ergebnisse

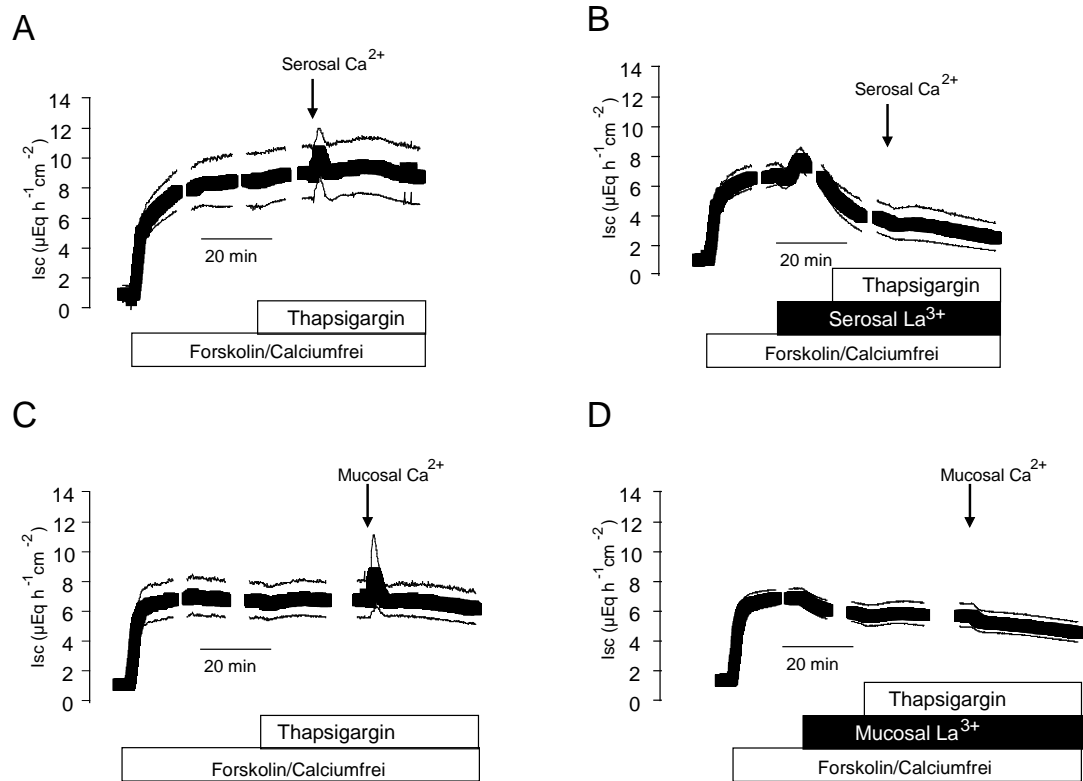


Abb. 7-11: Ca^{2+} -induzierter Isc nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung.

Der Effekt von Ca^{2+} -Speicher-Entleerung/Wiederfüllung wurde entweder auf der serosalen Seite (A, B) oder auf der mucosalen Seite (C, D) des Kolonepithels getestet. Zur Ca^{2+} -Speicher-Repletion von serosal wurde eine Ca^{2+} Konzentration von 1,25 mmol/l eingesetzt, zur Repletion von mucosal eine Konzentration von 12,5 mmol/l. Die Gewebe wurden mit Forskolin ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/l mucosal und serosal) sowie Thapsigargin (10^{-6} mol/l mucosal und serosal) vorbehandelt; das gesamte Experiment wurde in der Abwesenheit von serosalem Ca^{2+} durchgeführt. In den Experimenten in B und D wurde La^{3+} (10^{-3} mol/l; schwarzes Viereck) zu dem serosalen oder dem mucosalen Kompartiment dazugegeben. Die Unterbrechungen der Isc-Kurve durch Weglassen von Zeitintervallen von 5 – 10 min zustande, um die einzelnen Kurven auf die Zugabe der jeweiligen Substanzen zu synchronisieren. Die Werte sind Mittelwerte (Symbole) \pm SEM (Linien), $n = 5 - 6$. Die statistische Auswertung findet sich im Text.

7. Ergebnisse

7.4. Die Beteiligung des Zytoskelettes

Es erhebt sich die Frage, wie die Translokation von STIM1 zur basolateralen und zur apikalen Seite der Darmepithelzellen vermittelt wird. Der Ablauf des normalen Ca^{2+} -Signalwegs, zumindest wenn er durch physiologische Agonisten eingeleitet wird, benötigt ein intaktes Aktin- und Tubulin-Zytoskelett in 3T3-Fibroblasten (Ribeiro et al. 1997). In der human-embryonalen Nierenzelllinie HEK293 wird der so genannte I_{CRAC} (Ca^{2+} -release activated current) durch Nocodazol, eine Substanz, die Mikrotubuli depolymerisiert (Smyth et al. 2007), gehemmt, und in Jurkat T-Lymphozyten wird durch Colchicin die intrazelluläre STIM1-Translokation gehemmt (Barr et al. 2008). Daher erschien es interessant zu prüfen ob am Kolonepithel der Ratte Substanzen, die mit dem Zytoskelett interagieren, die Wirkung von apikaler oder basolateraler Ca^{2+} -Repletion nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung hemmen. Es wurde das gleiche Versuchsprotokoll wie unter 7.3. beschrieben verwendet mit der Modifikation, dass die jeweiligen Zytoskelettblocker 30 min vor der Zugabe von Forskolin verabreicht wurden. Die jeweiligen Inhibitoren wurden in Konzentrationen eingesetzt, von denen aus früheren Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe bekannt war, dass sie z.B. den volumensensitiven K^+ Ausstrom (Ribeiro et al. 2001) oder den Ca^{2+} -induzierten Cl^- Efflux (Hennig et al. 2008) am Kolon der Ratte hemmen, die Integrität des Zellverbands aber noch erhalten bleibt, was eine Grundvoraussetzung ist für transepitheliale Voltage-Clamp Versuche mit der Ussingkammer.

Zuerst wurde die Wirkung von Colchicin ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l auf der serosalen Seite; siehe auch 5.7.2.) getestet. Colchicin löst eine Depolymerisation von Mikrotubuli aus (Schroer, Sheetz 1991). Allerdings führte die Vorbehandlung mit Colchicin zu keiner Hemmung des durch serosales oder mucosales Ca^{2+} hervorgerufenen Isc (siehe Tabelle 7-1, 7-2). Serosale Ca^{2+} -Repletion löste einen Anstieg des Isc um $7,73 \pm 0,51 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 7$) unter Kontrollbedingungen aus. Nach Vorbehandlung mit Colchicin betrug dieser Anstieg $6,28 \pm 0,32 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 7$, Unterschied nicht signifikant, Tabelle 7-1). Die Antwort auf mucosales Ca^{2+} nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung fiel in dieser Versuchsserie mit $6,15 \pm 1,41 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ unter Kontrollbedingungen ($n = 6$) ungewöhnlich groß aus. Aber auch hier war keine Hemmung durch Colchicin (Ca^{2+} -induzierter Isc: $7,81 \pm 3,73 \mu\text{Eq/h/cm}^2$; $n = 6$) zu beobachten (Tabelle 7-2).

Vorherigere Behandlung des Gewebes mit Jasplakinolide (10^{-6} mol/l serosal, siehe auch 5.7.7.), welches das Aktin-Zytoskelett durch der Stabilisierung des F-Aktins verstärkt

7. Ergebnisse

(Ahmed et al. 2000; Bubb et al. 1994), behinderte den Isc, der durch basolaterale Ca^{2+} -Speicher-Wiederfüllung induziert wurde, nicht. Der Stromanstieg betrug $5,39 \pm 0,99 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 6$) unter Kontrollbedingungen und $4,35 \pm 0,99 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 6$) in Anwesenheit von Jasplakinolide (Tabelle 7-1). Anders sah es aus mit der Wirkung von apikalem Ca^{2+} . Hier nahm der Ca^{2+} -induzierte Isc tendenziell von $1,32 \pm 0,40 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 9$) unter Kontrollbedingungen auf $0,72 \pm 0,25 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 9$) in Gegenwart von Jasplakinolide ab, ein Effekt, der aber keine statistische Signifikanz erreichte (Tabelle 7-2).

Leider war es nicht möglich, das reverse Experiment, nämlich eine Depolymerisation von F-Aktin durch Behandlung mit Cytochalasin D (10^{-5} mol/l serosal), durchzuführen. Cytochalasin selbst führte nämlich zu einer massiven Zunahme der Gewebeleitfähigkeit (Daten nicht gezeigt, $n = 7 - 8$), führte also wahrscheinlich zu einer Zerstörung der Zellkontakte und machte daher eine transepitheliale Voltage-Clamp-Messung unmöglich.

Schließlich wurde getestet, ob Brefeldin A ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l serosal, siehe 5.7.3.) mit Ca^{2+} -induzierten Strömen nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung interferiert. Brefeldin A behindert den vesikulären Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat (Misumi et al. 1986; Klausner et al. 1992). Brefeldin A hemmte signifikant den durch serosales Ca^{2+} hervorgerufenen Isc von $8,89 \pm 0,97 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 5$) unter Kontrollbedingungen auf $3,20 \pm 1,00 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 5$, $P < 0,05$) in Gegenwart des Inhibitors. Auch die Antwort auf mucosale Ca^{2+} -Zugabe war tendenziell von $2,56 \pm 1,62 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ unter Kontrollbedingungen ($n = 6$) auf $0,56 \pm 0,34 \mu\text{Eq/h/cm}^2$ ($n = 5$) in Gegenwart von Brefeldin A vermindert, auch wenn diese Hemmung aufgrund der großen Streuung keine statistische Signifikanz erreichte.

7. Ergebnisse

Versuchs- bedingungen	Peak Δ Isc ($\mu\text{Eq/h/cm}^2$)	n
Ohne Colchicin	$7,73 \pm 0,51$	7
Mit Colchicin	$6,28 \pm 0,32$	7
Ohne Brefeldin A	$8,89 \pm 0,97$	5
Mit Brefeldin A	$3,20 \pm 1,00^*$	5
Ohne Jasplakinolide	$5,39 \pm 0,99$	6
Mit Jasplakinolide	$4,35 \pm 0,99$	6

Tabelle 7-1: Isc-Anstieg durch basolaterales Ca^{2+} (1,25 mmol/l) nach Ca^{2+} -Speicherdepletion.

Die Gewebe wurden in calciumfreier-Tyrodellösung inkubiert, bevor sie mit Forskolin ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/l mucosal und serosal) und Thapsigargin (10^{-6} mol/l mucosal und serosal) behandelt wurden (siehe Abb. 7-10 für das Versuchsprotokoll). Die Zugabe von Colchicin ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l serosal), Jasplakinolide (10^{-6} mol/l serosal) oder Brefeldin A ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l serosal) erfolgte 30 min bzw. im Fall von Jasplakinolide 45 min vor Zugabe von Forskolin. Angegeben ist der maximale durch Ca^{2+} -Zugabe induzierte Isc als Differenz zur Baseline direkt vor Ca^{2+} -Zugabe (Peak Δ Isc). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM * $P < 0,05$ versus Ca^{2+} -induzierter Isc in der Abwesenheit des jeweiligen Inhibitors.

7. Ergebnisse

Versuchs- bedingungen	Peak Δ Isc ($\mu\text{Eq/h/cm}^2$)	n
Ohne Colchicin	$6,15 \pm 1,41$	6
Mit Colchicin	$7,81 \pm 3,73$	6
Ohne Brefeldin A	$2,56 \pm 1,62$	6
Mit Brefeldin A	$0,56 \pm 0,34$	5
Ohne Jasplakinolide	$1,32 \pm 0,40$	9
Mit Jasplakinolide	$0,72 \pm 0,25$	9

Tabelle 7-2: Isc-Anstieg durch apikales Ca^{2+} (12,5 mmol/l) nach Ca^{2+} -Speicherdepletion.

Die Gewebe wurden in calciumfreier-Tyrodellösung inkubiert, bevor sie mit Forskolin ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/l mucosal und serosal) und Thapsigargin (10^{-6} mol/l mucosal und serosal) behandelt wurden (siehe Abb. 7-10 für das Versuchsprotokoll). Die Zugabe von Colchicin ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l serosal), Jasplakinolide (10^{-6} mol/l serosal) oder Brefeldin A ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l serosal) erfolgte 30 min bzw. im Fall von Jasplakinolide 45 min vor Zugabe von Forskolin. Angegeben ist der maximale durch Ca^{2+} -Zugabe induzierte Isc als Differenz zur Baseline direkt vor Ca^{2+} -Zugabe (Peak Δ Isc). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM * $P < 0,05$ versus Ca^{2+} -induzierter Isc in der Abwesenheit des jeweiligen Inhibitors.

7. Ergebnisse

7.5. Calcium-Imaging Experimente an HT29/B6-Zellen

Es stehen bislang keine pharmakologischen Inhibitoren zur Verfügung, um die Funktion von STIM1 zu hemmen. Aus diesem Grund wurden Experimente mit siRNA durchgeführt, um zu überprüfen, wie eine Downregulation dieses Proteins sich auf das durch Agonisten ausgelöste Ca^{2+} -Signalling auswirkt. Weil eine Vorinkubation mit der betreffenden siRNA eine Voraussetzung für diesen Versuchsansatz ist, wurde diese Serie von Experimenten mit einer Kolontumorzelllinie, den HT29/B6-Zellen, durchgeführt. Änderungen in der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration dieser Zellen wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 gemessen. Als Agonist wurde Carbachol, dies ist ein Struktur analogon des Neurotransmitters Acetylcholin, verwendet.

Um die Anwesenheit von SOCE in HT29/B6-Zellen zu untersuchen, wurde ähnlich wie am intakten Kolon ein Ca^{2+} -Speicher-Entleerung/Wiederfüllungs-Protokoll verwendet. Die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher wurden durch die Inkubation in Ca^{2+} -freiem Medium kombiniert mit dem SERCA-Blocker Cyclopiazonsäure (10^{-5} mol/l) entleert. Wiederrückgabe von Ca^{2+} (1,25 mmol/l) unter diese Bedingungen evozierte eine schnelle Zunahme in der Fura-2-Signal-Ratio von $0,16 \pm 0,010$ ($n = 82$; Abb. 7-12, B). Wenn die Zellen vorher mit Gd^{3+} ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/l), einem Blocker von speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanälen, behandelt wurden, war diese Zunahme auf $0,066 \pm 0,0091$ vermindert ($n = 54$, $P < 0,05$ gegen Antwort in der Abwesenheit von Gd^{3+} , Abb. 7-12, A).

Carbachol ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) löste eine promptte Zunahme der Fura-2-Ratio aus, d.h. der Agonist erzeugte einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration an diesen Zellen (Abb. 7-13, A). Innerhalb von einer Minute stieg die Fura-2 Ratio auf ein Maximum (Peak) an und fiel dann exponentiell ab. Um diese zweite Phase der Carbachol-Antwort zu quantifizieren, wurde die Zunahme in der Fura-2-Ratio nach 5 min bzw. 10 min als Differenz zur Basislinie direkt vor Zugabe von Carbachol gemessen.

Bevor das eigentlich angestrebte Experiment mit der siRNA durchgeführt wurde, wurden mehrere Versuchsserien angesetzt, um die Wirkung von Carbachol an diesen Zellen durch Einsatz von pharmakologischen Hemmstoffen besser zu charakterisieren. An den meisten Zellen löst Carbachol eine anfängliche Ca^{2+} -Freisetzung via Stimulation von IP_3 -Rezeptoren aus, dem ein Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} folgt (Parekh, Penner 1997). Auch an den HT29/B6-Zellen ließ sich dementsprechend die Wirkung von Carbachol praktisch vollständig unterdrücken, wenn intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher vor der

7. Ergebnisse

Carbacholzugabe durch den SERCA-Blocker Cyclopiazonsäure (10^{-5} mol/l) entleert wurden (Tabelle 7-3). Der Peak der Carbachol-Antwort, aber nicht die Plateauphase, war deutlich reduziert in Anwesenheit von 2-Aminophenylborat (10^{-5} mol/l), einem Blocker von IP_3 -Rezeptoren (Maruyama et al. 1997). Rutheniumrot ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) hingegen, welches Ryanodin-Rezeptoren hemmt (Xu et al. 1999), war wirkungslos (Tabelle 7-3), was in Übereinklang mit der oben erwähnten Modellvorstellung zur Wirkung von Carbachol an nicht erregbaren Zellen steht.

In Übereinstimmung mit diesem Modell war auch die Beobachtung, dass eine Inkubation in einer nominalen Ca^{2+} -freien Puffer-Lösung deutlich die zweite Phase der Carbachol-Antwort um etwa 50 % hemmte. Aber auch der initiale Peak-Wert, den Carbachol auslöste und von dem vermutet wird, dass er durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern verursacht wird, wurde signifikant reduziert, was darauf hinweist, dass es wohl zu einer partiellen Ca^{2+} -Speicher-Entleerung in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} kommt (Tabelle 7-3).

Einen paradoxen Effekt hatte La^{3+} (10^{-3} mol/l). Lanthan blockiert den speichergesteuerten Kationenstrom am Kolonepithel der Ratte (Frings et al. 1999) und an HT29-Zellen (Kerst et al. 1995). Die Zugabe von La^{3+} löste in der Mehrzahl der untersuchten Zellen eine transiente Serie von Ca^{2+} Spikes aus (Abb. 7-12). Wenn dann Carbachol zugegeben wurde, war die Peak-Antwort auf den cholinergen Agonisten signifikant gehemmt, nicht aber der langanhaltende Anstieg der Fura-2-Ratio (siehe Tabelle 7-3 und Diskussion).

7. Ergebnisse

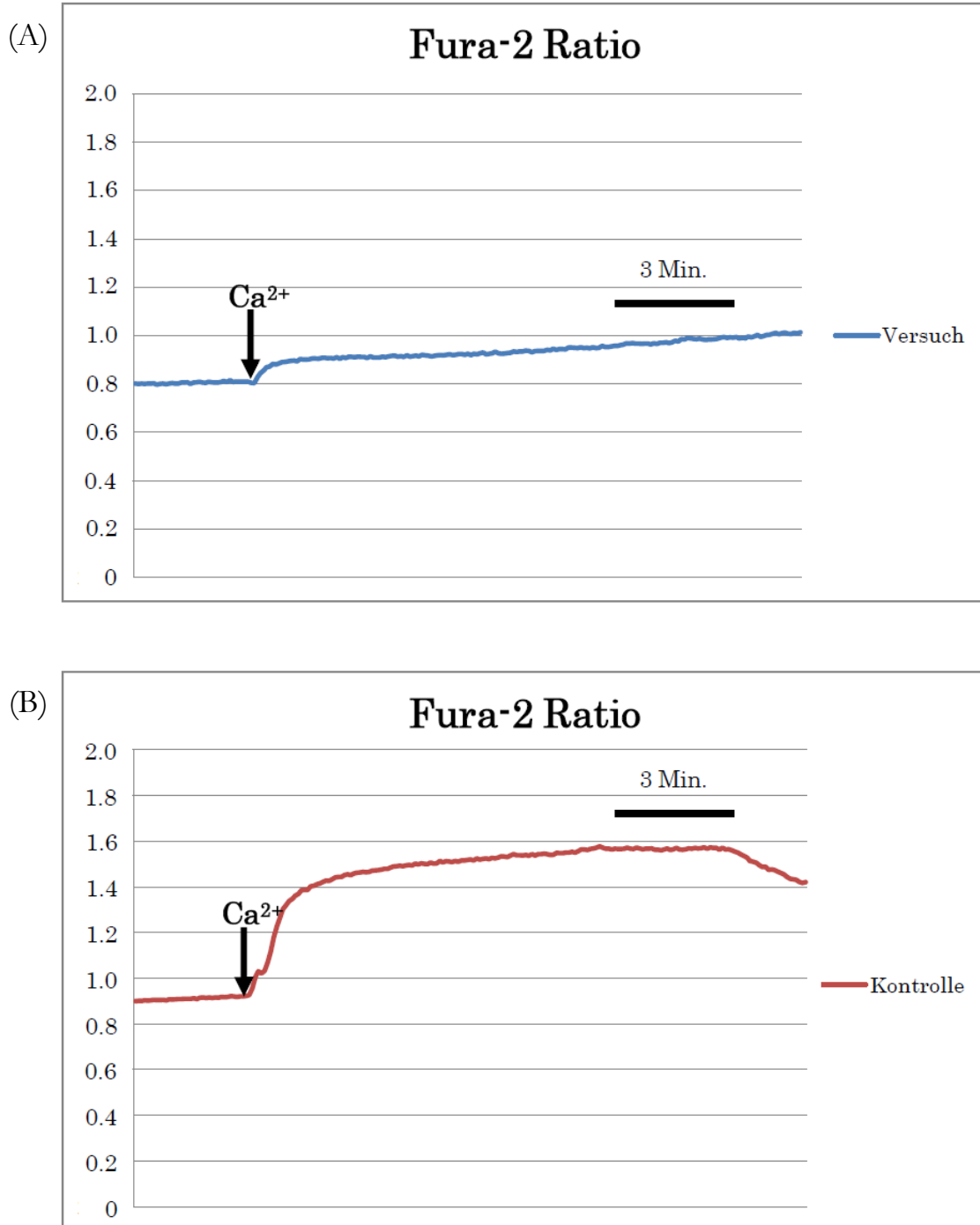


Abb. 7-12: Originaltracing der Wirkung einer Ca²⁺-Speicher-Wiederauffüllung nach Ca²⁺-Speicher-Entleerung an HT29/B6-Zellen

HT29/B6-Zellen wurden in einem Ca²⁺-freiem Medium mit Cyclopiazonsäure (10⁻⁵ mol/l) in der (A) Anwesenheit und (B) Abwesenheit von Gd³⁺ (5·10⁻⁶ mol/l) inkubiert. Die Konzentration von Ca²⁺ (Pfeil) betrug 1,25 mmol/l. Typische Messung an n = 52 – 84 Zellen.

7. Ergebnisse

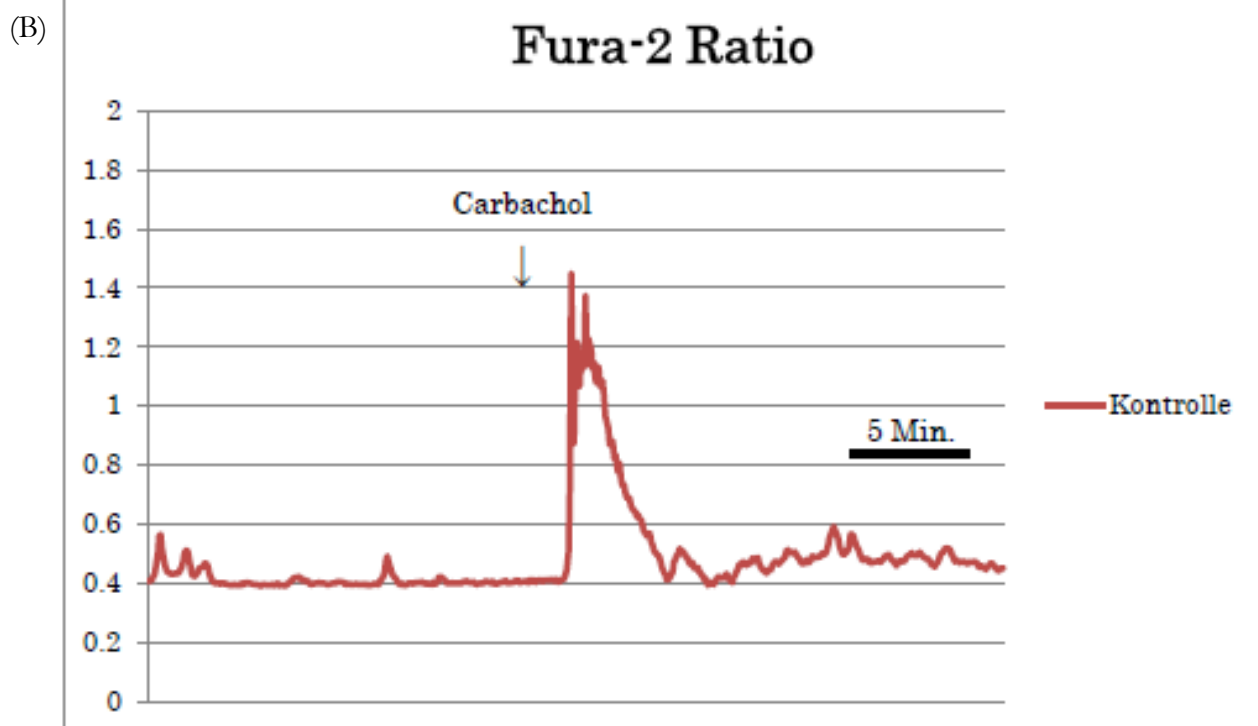
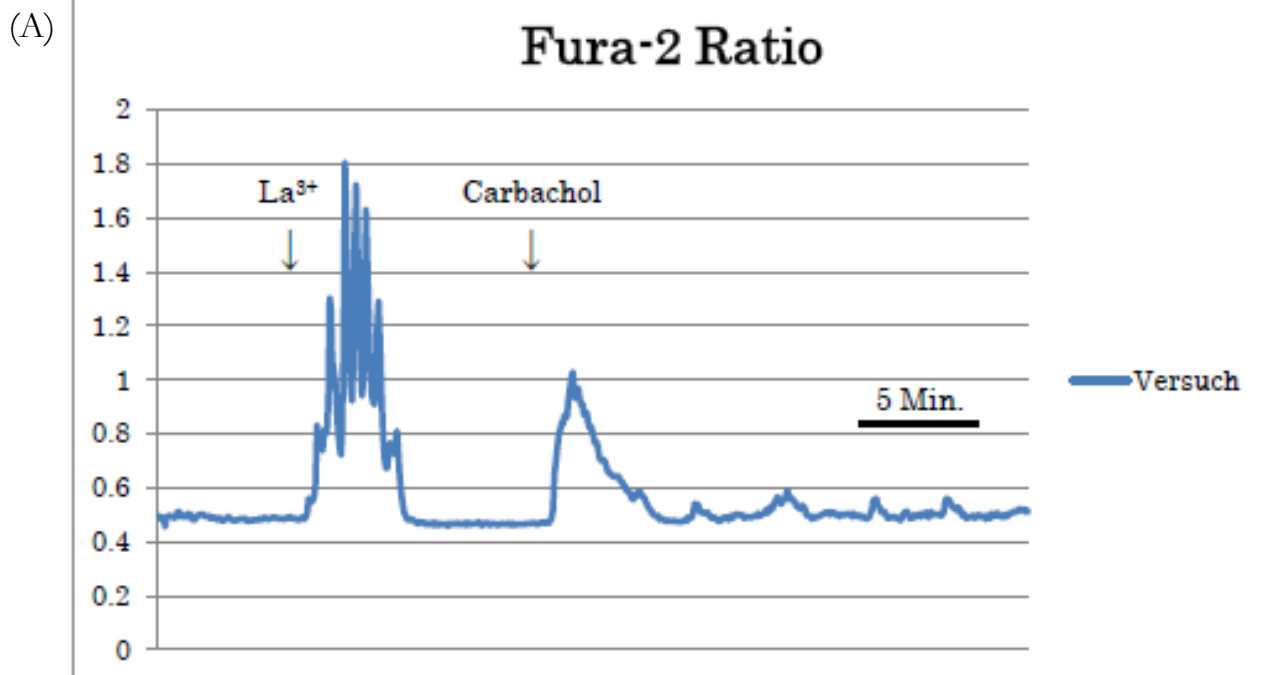


Abb. 7-13: Originaltracing von Fura-2 Messungen an HT29/B6-Zellen.

Die Wirkung von Carbachol ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) ist gezeigt in Anwesenheit (A) oder Abwesenheit (B) von LaCl_3 (10^{-3} mol/l).

7. Ergebnisse

Wenn die Zellen mit siRNA gegen STIM1 vorbehandelt wurden, wurden zwei Änderungen in der Antwort, die durch Carbachol eingeleitet wurde, beobachtet. Der Peak der Carbacholantwort nahm um etwa 40 % ab und 5 Minuten nach der Zugabe des cholinergen Agonisten war der sonst (vergl. Abb. 7-13) noch bestehende Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration komplett verschwunden (Tabelle 7-3). Beide Effekte waren statistisch signifikant.

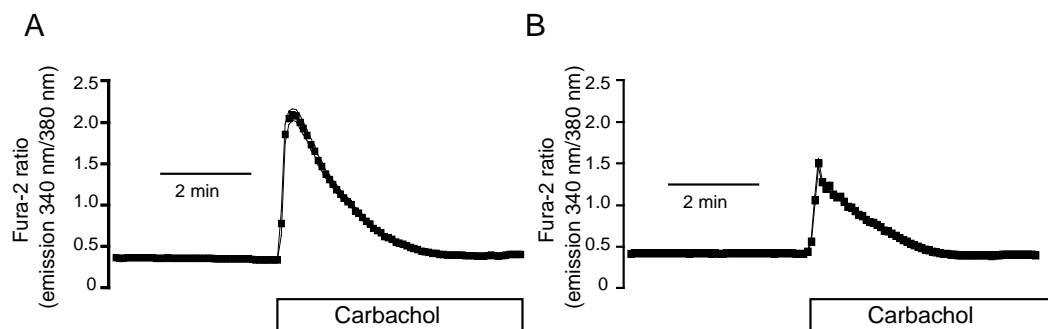


Abb. 7-14: Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Carbachol ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, weißes Viereck) an HT29/B6-Zellen unter Kontrolle-Konditionen (A) oder nach Transfektion der Zellen mit siRNA gegen STIM1 (B).

Daten sind Mittelwerte (Symbolen) \pm SEM (Linie), $n = 27 - 65$. Für die Statistik, siehe Tabelle 7-3.

7. Ergebnisse

Konditionen	Carbachol Δ Fura ($\mu\text{Eq/h/cm}^2$)			n
	Peak	5 min	10 min	
Mit Ca^{2+}_e	$1,20 \pm 0,065$	$0,35 \pm 0,029$	$0,14 \pm 0,022$	72
Ohne Ca^{2+}_e	$0,84 \pm 0,059^*$	$0,16 \pm 0,022^*$	$0,033 \pm 0,009^*$	60
Ohne Cyclopiazonsäure	$0,97 \pm 0,070$	$0,22 \pm 0,026$	$0,093 \pm 0,016$	84
Mit Cyclopiazonsäure	$0,005 \pm 0,006^*$	$-0,075 \pm 0,009^*$	$-0,13 \pm 0,014^*$	84
Ohne 2-APB	$1,65 \pm 0,091$	$0,65 \pm 0,043$	$0,41 \pm 0,037$	72
Mit 2-APB	$1,15 \pm 0,065^*$	$0,54 \pm 0,041$	$0,35 \pm 0,035$	72
Ohne Rutheniumrot	$1,67 \pm 0,11$	$0,33 \pm 0,036$	$0,20 \pm 0,028$	72
Mit Rutheniumrot	$1,55 \pm 0,083$	$0,48 \pm 0,041$	$0,27 \pm 0,028$	77
Ohne LaCl_3	$1,14 \pm 0,066$	$0,10 \pm 0,018$	$0,069 \pm 0,012$	84
Mit LaCl_3	$0,50 \pm 0,057^*$	$0,21 \pm 0,032^*$	$0,011 \pm 0,011^*$	81
Ohne siRNA	$1,88 \pm 0,064$	$0,45 \pm 0,030$	$0,027 \pm 0,011$	27
Mit siRNA	$1,13 \pm 0,047^*$	$0,30 \pm 0,018^*$	$-0,027 \pm 0,004^*$	69

Tabelle 7-3: Effekt von Carbachol ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) auf das Fura-2-Ratio-Signal an HT29/B6-Zellen.

Die Antwort auf Carbachol wurde in der Abwesenheit oder Anwesenheit von Cyclopiazonsäure (10^{-5} mol/l), 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB; 10^{-5} mol/l), Rutheniumrot ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) oder Lanthan (10^{-3} mol/l) sowie nach Transfektion der Zellen mit siRNA gegen STIM1, oder in der Abwesenheit und der Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (Ca^{2+}_e) geprüft. Daten sind als Differenz zu jeweiligen Baseline direkt vor Zugabe von Carbachol (Δ Fura-2) angegeben. Angegeben sind das Maximum in der Fura-2-Ratio (Peak) und der Wert 5 bzw. 10 min nach Zugabe von Carbachol. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM, * $P < 0,05$ gegenüber Antwort auf Carbachol in der Abwesenheit des jeweiligen Inhibitors.

7. Ergebnisse

7.6. Immuncytochemische Färbung von HT29/B6-Zellen

Um die Downregulation von STIM1s durch die siRNA-Transfektion zu überprüfen, wurde eine immuncytochemische Färbung gegen STIM1 durchgeführt. Die immuncytochemische Färbung zeigte qualitativ eine ausgeprägte Abnahme der STIM1-Immunoreaktivität in Zellen, die mit siRNA transfiziert wurden im Vergleich zu nichttransfizierten Zellen (Abb. 7-14). Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurde eine morphometrische Analyse durchgeführt. Dazu wurden zufällig gewählte Regionen der Kulturschalen mit den HT29/B6-Zellen mit gleicher Kameraeinstellung fotografiert und die jeweiligen Fluoreszenzwerte jedes Bildpixels in einer 8 bit-Graustufenskala digitalisiert. Ein Schwellenwert von 80 in dieser von 0 bis 255 reichenden Graustufenskala, der einer diffusen Hintergrundfluoreszenz der Zellen entsprach, wurde gewählt, um zellfreie und zellenthaltende Regionen der Kulturschalen zu differenzieren. Ausgewertet wurden nur Pixel, die über diesem Schwellenwert lagen, um Schwankungen durch die unterschiedliche Dichte der noch nicht konfluent wachsenden Zellen auszugleichen.

Eine Analyse der zellenthaltenden Zonen der Kulturschalen ergab, dass die STIM1-Fluoreszenzintensität nach Behandlung der Zellen mit der siRNA gegen STIM1 von $144,7 \pm 3,6$ (n = 46 Fotos) auf $115,4 \pm 3,1$ (n = 48 Fotos) abfiel ($P < 0,05$ versus Kontrolle, siehe Abb. 7-15).

7. Ergebnisse

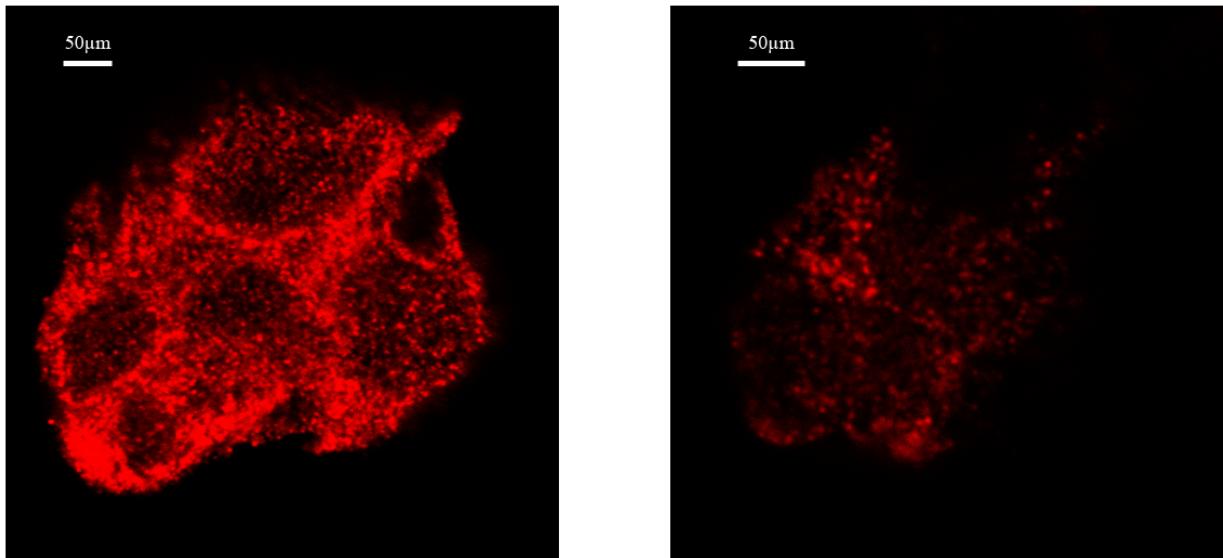


Abb. 7-15: Immuncytochemische Färbung der HT29/B6-Zellen gegen STIM1.

Kontrolle (links) und Situation nach Transfektion der Zellen mit siRNA gegen STIM1 (rechts). Alle Bilder wurden mit der gleichen Aufnahmezeit/Verstärkung der Kamera aufgenommen. Repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Für die Statistik und die morphometrische Analyse, siehe Abb. 7-15.

7. Ergebnisse

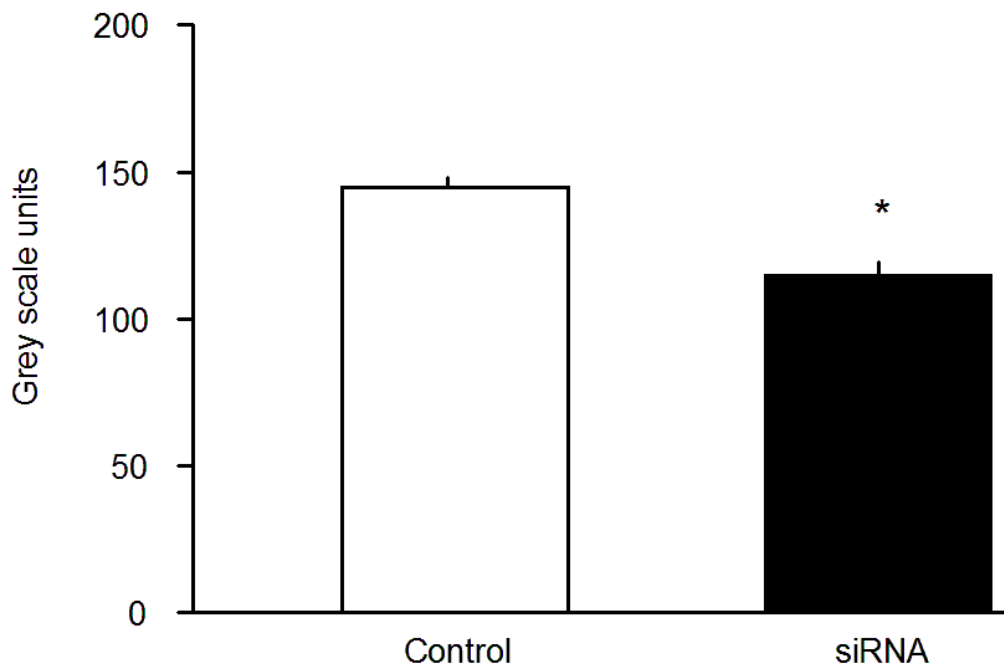


Abb. 7-16: Analyse der zellenthaltenden Zonen der Kulturschalen.

Die STIM1-Fluoreszenzintensität fiel nach Behandlung der Zellen mit der siRNA gegen STIM1 von $144,7 \pm 3,6$ ($n = 46$ Fotos) auf $115,4 \pm 3,1$ ($n = 48$ Fotos) ab ($P < 0,05$ versus Kontrolle).

8. Diskussion

8.1. Expression von STIMs und Orais im Kolonepithel

Die Ergebnisse zeigen, dass STIM1 und Orai1, die eine zentrale Rolle beim kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom in verschiedenen Zellen wie zum Beispiel T-Lymphozyten (Ritchie et al. 2012), B-Lymphozyten (Matsumoto et al. 2011) oder Neuronen (Gruszczynska-Biegala et al. 2011) spielen, auch im Kolonepithel der Ratte exprimiert werden (siehe 7.1.). Das gleiche gilt für ihre Isoformen STIM2, Orai2 und Orai3, auch wenn zu diesen keine weiteren funktionellen Untersuchungen (z.B. hinsichtlich Translokation) durchgeführt wurden.

STIM1 ist in der Lage, mittels seiner EF-Hand-Domäne, die im Lumen des endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, mit Ca^{2+} -Ionen zu interagieren. Die Folge einer Ca^{2+} -Speicher-Entleerung ist eine Aktivierung von STIM1 (Stathopulos, Ikura 2009). Diese Aktivierung äußert sich in einer Oligomerisation von STIM1-Molekülen und einer Akkumulation dieser Oligomere in Form von so genannten Puncta in der Nähe der Plasmamembran (Wu et al. 2006). Durch die räumliche Nähe der Puncta des endoplasmatischen Retikulums und der in der Plasmamembran lokalisierten Orai-Proteine formen sich so genannte Junctions zwischen der Plasmamembran und dem endoplasmatischen Retikulum (Deng et al. 2009), in denen durch die Interaktion von STIM1 mit Ca^{2+} -permeablen Ionenkanälen in der Zellmembran ein Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} ausgelöst wird (Abb. 8-1).

8. Diskussion

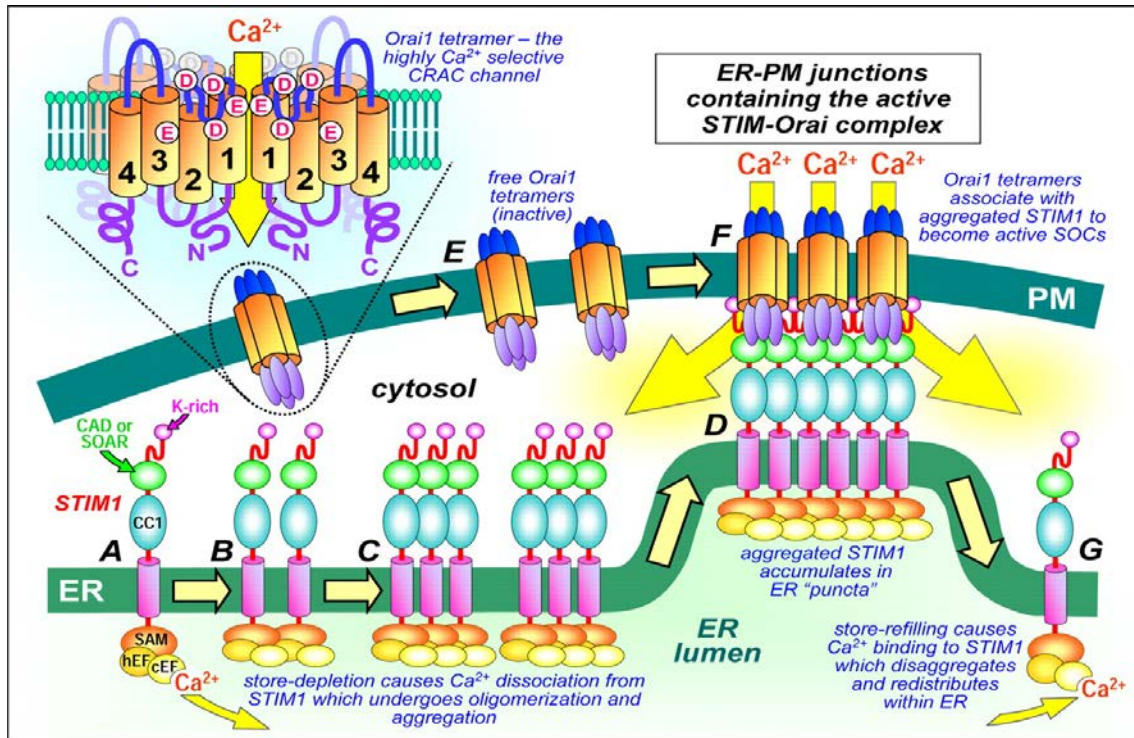


Abb. 8-1: Dynamische molekulare Kopplung zwischen STIM1 und Orai1 in den Junctions zwischen endoplasmatischem Retikulum und Plasmamembran.

Aus (Deng et al. 2009)

CAD: CRAC activation domain. SOAR: STIM1 orai activating region. K-rich: lysine-rich. CC1: coiled-coil domain 1. SAM: sterile alpha-motif. hEF: hidden EF-hand. cEF: canonical EF-hand.

(A) Durch die Ca^{2+} -Speicher-Entleerung wird Ca^{2+} aus der N-terminal gelegenen EF-hand von STIM1 abgelöst. Dies löst (B) eine schnelle Oligomerisation von STIM1 aufgrund von Entfaltung und Wechselwirkung zwischen EF-SAM-Domänen aus. Es aggregieren weitere STIM1-Moleküle durch Interaktionen zwischen dem C-terminalen CC1 und CAD/SOAR-Domänen (C). Es folgt die STIM1-Diffusion, Aggregation und Ansammlung von STIM1 in den Junctions (D). Diffusionsfähige Orai1-Tetramere in der Plasmamembran (E) werden in den Junctions (F) gebunden, woraus funktionsfähige speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle entstehen. Nach der Ca^{2+} -Speicher-Wiederfüllung (G) bindet wieder Ca^{2+} an STIM1, das sich daraufhin von Orai1 löst. Das Orai-Tetramer (links oben) ist mit seinen vier Transmembran-Domänen und Clustern aus Aspartat (D)- und Glutamat (E)-Resten, die den Ca^{2+} -selektiven Filter und die Pore begründen, dargestellt.

8. Diskussion

Über die Funktion von STIM2 hingegen ist noch deutlich weniger bekannt. Man geht davon aus, dass STIM1 hauptsächlich den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) aktiviert, während STIM2 eher auf den basalen Ca^{2+} -Level im endoplasmatischen Retikulum und den Ca^{2+} -Ausstrom Einfluss nehmen soll (Gruszczynska-Biegala et al. 2011). Andere Publikationen beschreiben eine modulierende Wirkung von STIM2 auf den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (Song et al. 2011) oder speicherabhängige und speicherunabhängige Orai-Kanal-Aktivierung (Parvez et al. 2008; Graham et al. 2011). Seine Bedeutung für die Ca^{2+} -Speicherregulation wird also noch sehr kontrovers diskutiert (López et al. 2012), wie in der folgenden Abb. (Abb. 8-2) zusammengefasst ist (Motiani et al. 2010).

8. Diskussion

Tissue	Expression or ratio		Ca ²⁺ -homeostasis STIM1/STIM2		
	STIM1	STIM2	SOCE	[Ca ²⁺] _c	ER [Ca ²⁺]
Human					
BCC (MCF7)	+	+	-/↑	-/-	-/-
BCC	↑	↓	↑/•	??	??
Myoblasts	=	=	↑/•	-/+	-/+
PASMC	+	+	↑/•	??	??
HEK293	=	=	↑/↓	-/+	↓/↑
HASMC	=	=	↑/↓	-/-	-/-
BCC (MB231)	+	+	↑/-	-/-	-/-
HL-60	=	=	↑/-	-/?	??
EMCL	↓	↑	??	-/+	??
BCC	=	=	??	-/+	??
HeLa	+	+	??	-/+	↓/↑
HUVEC	+	+	??	-/+	??
Mouse					
Neurons	↓	↑	-/↑	-/+	-/+
DC	↓	↑	-/↑	??	??
MEF	=	=	↑/•	-/-	+/-
T cells	↑	↓	↑/↓	-/-	+/-
B cells	=	=	↑/↓	-/-	??
Platelets	↑	↓	↑/↓	-/-	+/-

Abb. 8-2: Beitrag von STIM-Isoformen zur Ca²⁺-Homöostase in verschiedenen Zellen.

Aus (López et al. 2012)

(?) Keine Daten, (↑) Anstieg, (↓) Abfall, (•) mäßige Veränderung, (-) kein Beitrag, (=) ähnlich, (+) exprimiert oder Beitrag, ([Ca²⁺]_c) basale cytosolische Ca²⁺-Konzentration.

8. Diskussion

Im Kolonepithel der Ratte werden Orai1 und seine Isoformen Orai2 und Orai3 exprimiert. Orai2 verhält sich eher wie Orai1 als wie Orai3 (DeHaven et al. 2007) und soll auch als Ca^{2+} -Kanal fungieren (Mercer et al. 2006), auch wenn insgesamt das Wissen um die Funktion dieses Proteins noch relativ gering ist. Orai1 hingegen stellt eine Komponente von CRAC-Kanälen und von ARC-Kanälen dar, wobei bei den letztgenannten zusätzlich noch Orai3-Untereinheiten zum Kanal beitragen. Damit könnte das Kolonepithel sowohl CRAC- als auch ARC-Kanäle exprimieren. Eine Ko-Expression beider Kanaltypen in der gleichen Zelle wurde bereits von anderen Zellsystemen beschrieben (Mignen, Shuttleworth 2000). Beide Kanaltypen arbeiten zusammen (Shuttleworth 2012). Der Unterschied zwischen CRAC-Kanälen und ARC-Kanälen ist, dass CRAC-Kanäle nur bei der Ca^{2+} -Speicher-Entleerung aktiviert werden (Parekh 2007), ARC-Kanäle aber nicht speichergesteuert fungieren, sondern durch intrazelluläre Arachidonsäure aktiviert werden (Shuttleworth et al. 2007). Da diese Kanäle aber hochselektive Ca^{2+} -Leitfähigkeiten darstellen, der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom am Kolonepithel jedoch über eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit verläuft (Seip et al. 2001), erscheint der funktionelle Beitrag von CRAC- und ARC-Kanaltypen am Dickdarmepithel eher unwahrscheinlich.

8.2. Translokation nach Calcium-Speicher-Entleerung

Wie in der Einleitung dargestellt, spielen Ca^{2+} -Ionen als second messenger bei der Regulation intestinaler Transportvorgänge eine entscheidende Rolle. Üblicherweise nimmt man an, dass ein Einstrom von Ca^{2+} aus dem serosalen Kompartiment die Sekretion, die typische Ca^{2+} -abhängige Sekretagoge wie das stabile Acetylcholinderivat Carbachol auslösen, bestimmt, da diese Sekretion vermindert (aber nicht komplett aufgehoben) ist, wenn das serosale Kompartiment eine Ca^{2+} -freie Lösung enthält (Zimmerman et al. 1983). Die initiale Hypothese in den Experimenten, in denen die Translokation von STIM1 nach Ca^{2+} -Speicherentleerung untersucht wurde, war daher, dass STIM1 unter diesen Bedingungen zur basolateralen Membran transloziert.

Interessanterweise wurde die Akkumulation von STIM1 nicht nur nahe der basolateralen Membran (quantifiziert in Abb. 7-7 als Anstieg der STIM1 Immunoreaktivität in der Nähe des basalen Zellpols), sondern auch in der apikalen Membran gefunden. Diese Translokation wurde durch Ca^{2+} -Speicher-Entleerung mittels eines SERCA-Blockers (Cyclopiazonsäure) in einem Ca^{2+} -freien Medium ausgelöst (siehe Abb. 7-6, 7-7). Funktion

8. Diskussion

dieser Translokation ist, wie oben beschrieben, die Induktion eines Einstroms extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen, um die Ca^{2+} -Speicher letztlich wieder aufzufüllen und langanhaltende Ca^{2+} -Signale im Cytosol zu erzeugen.

Außerdem wurde ein starkes STIM1-Signal in den Krypten beobachtet (Abb. 7-6). Hier findet die Teilung von Stammzellen statt und STIM1 ist als fundamentaler Faktor für Proliferationsvorgänge bekannt (Abdullaev et al. 2008; Capiod 2011; El et al. 2010).

8.3. Bedeutung von apikalem und basolateralem speichergesteuertem Ca^{2+} -Einstrom für das Kolonepithel

Ein Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration löst eine Chloridsekretion am Kolonepithel aus. Vermittelt wird diese Anionensekretion durch Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle (CaCC) und den CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator)-Kanäle. Beide haben aber eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung (Ousingsawat et al. 2011). Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle sind an epithelialen Sekretionsvorgängen (Eggermont 2004), der Kontraktion des glatten Muskels (Manoury et al. 2010) und der Signaltransduktion in Riechzellen (Hartzell et al. 2005) beteiligt. Molekulare Grundlage für diese Anionenleitfähigkeit ist das Protein TMEM16A (Schroeder et al. 2008; Ousingsawat et al. 2011) (Abb. 8-3). TMEM16A und seine Isoformen bilden eine Proteinfamilie, zu der auch TMEM16B-K gehört (Rock, Harfe 2008). TMEM16-Proteine haben alle eine ähnliche putative Topologie. Sie besitzen acht Transmembran-Segmente und cytosolisch gelegene N- und C-Termini (Abb. 8-3).

8. Diskussion

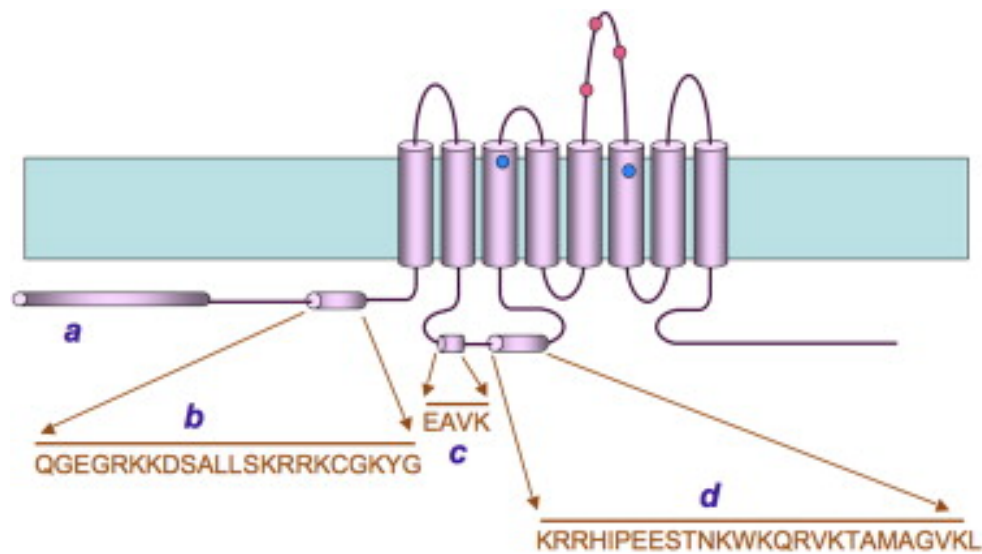


Abb. 8-3: Struktur des TMEM16A-Proteins.

Aus (Galiotta 2009)

Das Protein hat acht putative Transmembran-Domänen und intrazellulär gelegene N- und C-Termini. TMEM16A besitzt vier Segmente, die mit **a** (116 Aminosäuren), **b** (22 Aminosäuren), **c** (4 Aminosäuren) und **d** (26 Aminosäuren) bezeichnet sind und ist 1008 Aminosäuren lang.

8. Diskussion

Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle werden durch eine Zunahme der cytosolischen Konzentration von freiem Calciumionen aktiviert. Diese Ca^{2+} -Zunahme resultiert – wie oben beschrieben – aus der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speicher oder dem Einstrom über Kanäle in der Plasmamembran (Abb. 8-4). Wenn die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration Werte von 0,1 – 1,0 $\mu\text{mol/l}$ überschreitet (Frings et al. 2000), werden diese Chloridkanäle aktiviert. Moduliert wird ihre Aktivität durch das Membranpotential (Hartzell et al. 2005). Normalerweise werden Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle langsam aktiviert, wenn die Plasmamembran zu positiven Membranpotentialen depolarisiert wird, und deaktiviert, wenn die Plasmamembran wieder hyperpolarisiert (Arreola et al. 1996; Boese et al. 2004) (Abb. 8-4). Die Aktivierung durch das Membranpotential ist abhängig von Ca^{2+} . Wenn die Ca^{2+} -Konzentration sehr niedrig ist, dann kann die Depolarisation nicht die Kanäle aktivieren.

8. Diskussion

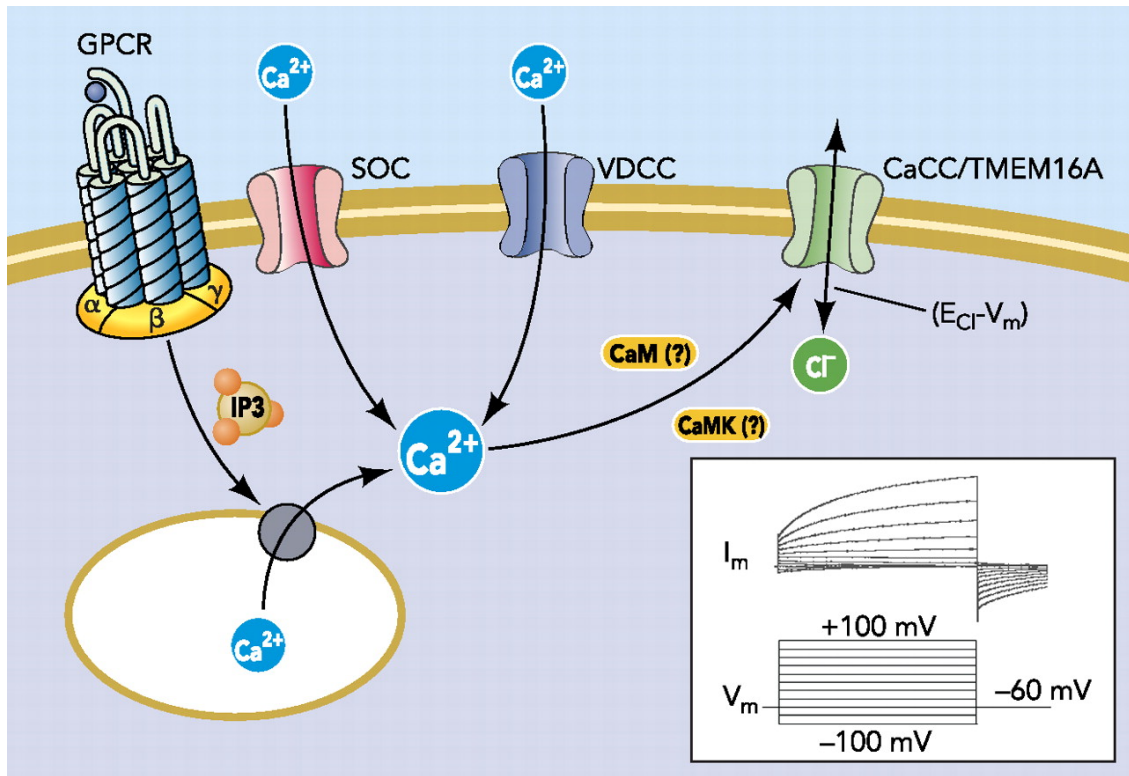


Abb. 8-4: Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanälen.

Aus (Ferrera et al. 2010)

IP_3 : Inositol-1,4,5-Trisphosphat.

CaM: Calmodulin.

CaMK: Calmodulinkinase.

GPCR: G-protein-coupled receptor.

SOC: store-operated Ca^{2+} channel.

VDCCs: voltage-dependent Ca^{2+} channel.

Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle werden durch Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Freisetzung aus intrazellulären Speichern bzw. Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum aktiviert. Der Ausstrom von Chlorid ist abhängig von dem Unterschied zwischen dem Chlorid-Gleichgewichtspotential und dem Membranpotential ($E_{\text{Cl}} - V_m$). Der inset zeigt Stromspannungskurven der Ca^{2+} -abhängiger Chloridleitfähigkeit.

8. Diskussion

Es gibt noch einen weiteren Kanaltyp an Epithelzellen, der durch cytosolisches Ca^{2+} aktiviert wird, nämlich Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle. Davon sind mehrere Subtypen bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Einzelkanalleitfähigkeit unterscheiden. So gibt es Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (big conductance oder BK_{Ca} -Kanäle) und solcher mit niedriger Leitfähigkeit (small conductance oder SK_{Ca} -Kanäle) (Cox 2011). Beide sind Homotetramere und beide enthalten eine integrale Membran-Domäne. Diese Domäne ist aufgebaut wie bei spannungsabhängigen K^+ -Kanälen. Insgesamt weisen aber BK_{Ca} - und SK_{Ca} -Kanäle nur eine sehr geringe Sequenzhomologie auf und sie unterscheiden sich darin, wie sie Veränderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erkennen (Cox 2011). BK_{Ca} -Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der neuronalen Signalverarbeitung (Sah, Faber 2002; Vergara et al. 1998), da sie zur Repolarisation nach einem Aktionspotential beitragen (Edgerton, Reinhart 2003; Adams et al. 1982; Yazejian et al. 1997; Lancaster, Nicoll 1987) und dendritische Ca^{2+} -Spikes kontrollieren (Golding et al. 1999). Außerdem koppeln sie Membranpotential und cytosolische Ca^{2+} -Konzentration aneinander, worüber die Freisetzung von Hormonen und Transmittern reguliert wird (Petersen, Maruyama 1984; Raffaelli et al. 2004).

BK_{Ca} -Kanäle bestehen aus vier identischen porenbildenden alpha-Untereinheiten. In einigen Geweben kommen unterstützende beta-Untereinheiten hinzu (Lee, Cui 2010) (siehe auch Abb. 8-5). Der Kanal hat sieben Transmembrandomänen (S0 bis S6, Abb. 8-5) und sein N- Terminus ist extrazellulär lokalisiert (Meera et al. 1997) (Abb. 8-5). Er besitzt auch einen sehr großen intrazellulären C-Terminus, der für die Ca^{2+} -Abhängigkeit des Kanals verantwortlich ist (Meera et al. 1997) (Abb. 8-5). BK_{Ca} -Kanäle werden durch Ca^{2+} und durch Depolarisation aktiviert (Berkefeld et al. 2006; Rothberg 2012). Erst wenn die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration ansteigt, verschiebt sich die Depolarisation, die für die Öffnung des Kanals notwendig ist, in den physiologischen Bereich (Brenner et al. 2000).

8. Diskussion

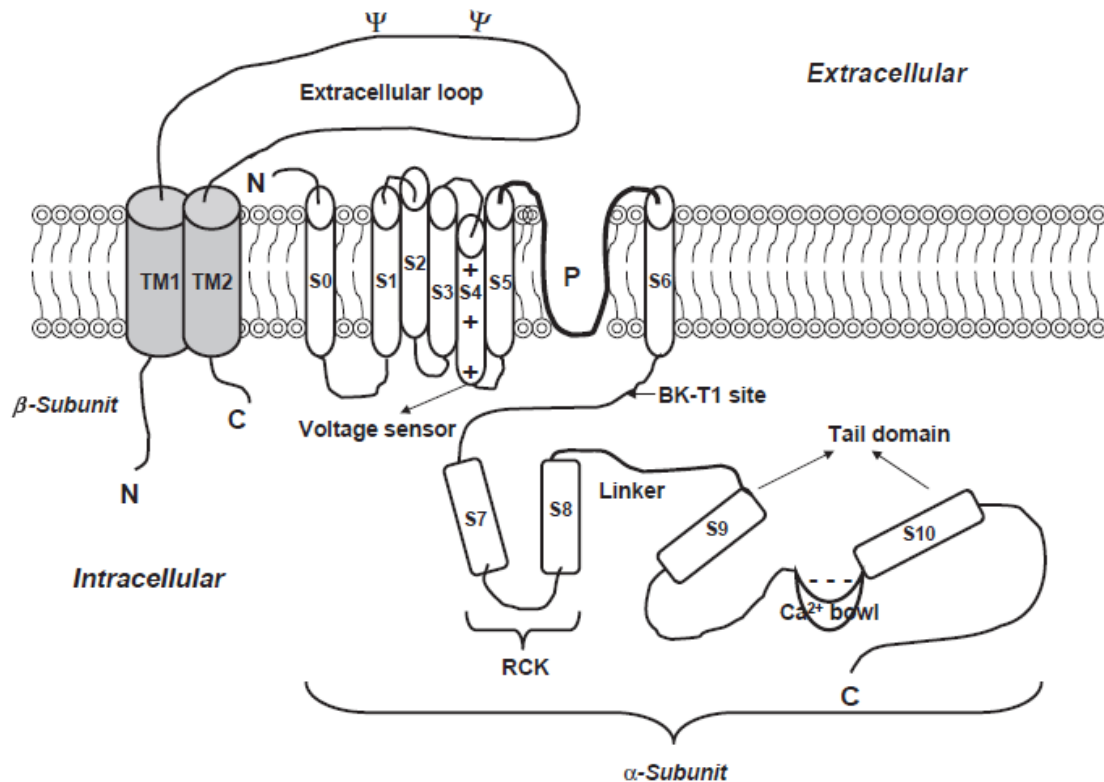


Abb. 8-5: Struktur von BK_{Ca} (big conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels)-Kanälen.

Aus (Ghatta et al. 2006)

TM: transmembrane domain

S: segment

P: pore

RCK: regulators of K^+ conductance

Der zweite wichtige Typ von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen, die SK_{Ca} -Kanäle, werden im gesamten Zentralnervensystem gefunden (Adelman et al. 2012). Sie spielen eine Rolle als Feedback-Regulator bei verschiedenen neuronalen Prozessen wie z.B. dem Auslösen repetitiver Aktionspotentiale, dem dendritischem Ca^{2+} -Anstieg oder auch intrazellulärer Signale, die durch Endocannabinoide ausgelöst werden (Faber 2009). Die SK_{Ca} -Kanalfamilie umfasst drei Mitglieder (SK1, SK2 und SK3) (Köhler et al. 1996). Diese zeigen eine sehr ähnliche Topologie. Alle Formen homotetramersische Kanäle. Sie sind zwischen 553 und 580 Aminosäuren lang und jeder Kanal enthält eine K^+ -Kanal-Porenregion und sechs Transmembran-Segmente (S1-S6) (Köhler et al. 1996) (Abb. 8-6).

8. Diskussion

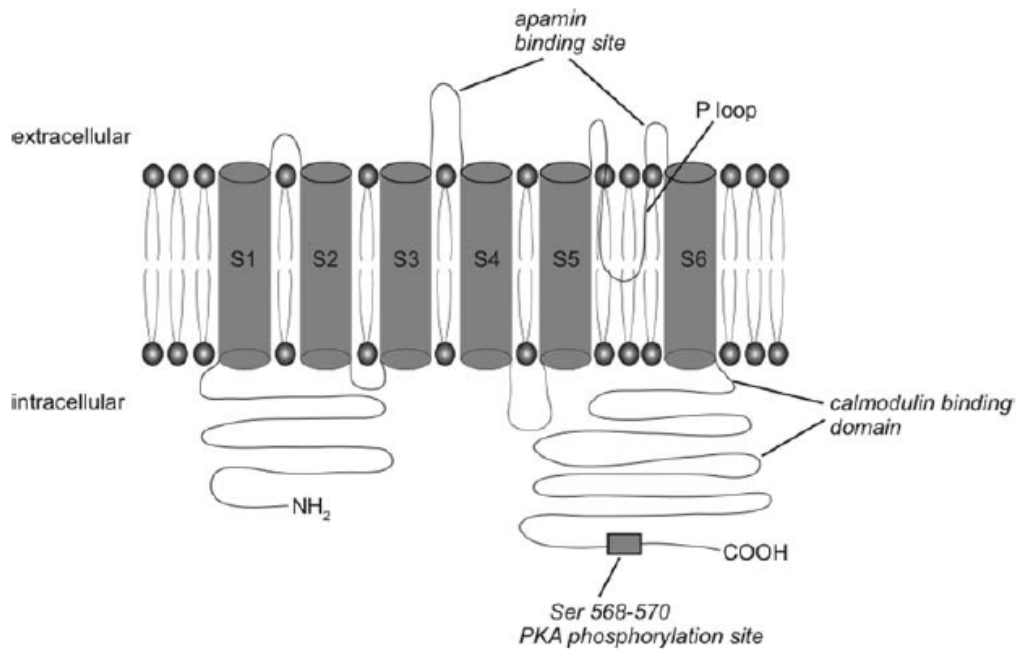


Abb. 8-6: Struktur von SK_{Ca}-Kanälen.

Aus (Faber 2009)

Im Unterschied zu BK_{Ca}-Kanälen sind SK_{Ca}-Kanäle nicht spannungsabhängig, offenkundig weil sie die positiv geladenen Aminosäuren-Reste, die für das spannungsabhängige Gating verantwortlich sind, verloren haben (Aggarwal, MacKinnon 1996; Sigg, Bezanilla 1997). Die drei SK-Kanäle zeigen 80 bis 90 % Sequenz-Identität (Köhler et al. 1996). Ein viertes Mitglied dieser Familie wurde entdeckt (Ishii et al. 1997), das als IK (intermediate conductance) oder SK4-Kanal bezeichnet wird (Joiner et al. 1997). Alle SK_{Ca}-Kanäle werden durch Ca²⁺ aktiviert (Ishii et al. 1997; Xia et al. 1998). Dazu ist Calmodulin notwendig (Xia et al. 1998). Calmodulin ist ein cytoplasmatisches Protein aus 148 Aminosäuren, das in allen Zelltypen gefunden wird und bei vielen zellulären Prozessen als Ca²⁺-Sensor fungiert (Cox 2011).

Diese Ca²⁺-abhängigen Cl⁻- und K⁺-Kanäle tragen in unterschiedlichem Ausmaß zur Ca²⁺-induzierten Sekretion am Kolon bei. Eine Anionensekretion lässt sich in vitro typischerweise auslösen durch Ca²⁺-abhängige Sekretagoge wie etwa Carbachol (Zimmerman et al. 1983). Die Zunahme in der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration aktiviert vor allem basolaterale Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle (Böhme et al. 1991). Diese Kalium-Kanäle bestimmen die Treibkraft für den Chloridausstrom über apikale Chlorid-Kanäle.

8. Diskussion

Experimente, in denen mittels einer Kaliumdepolarisation die basolaterale Membran „ausgeschaltet“ wurde, ließen aber noch zwei weitere Angriffsorte von cytosolischem Ca^{2+} während der Ca^{2+} -induzierten Sekretion erkennen. Das sind Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle in der apikalen Membran, die nur dann durch Carbachol aktiviert werden, wenn im mucosalen Kompartiment Ca^{2+} vorhanden ist (Schultheiss et al. 2003). Mehrere Formen von Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen wurden bisher in der apikalen Membran des Kolonepithels entdeckt, nämlich big-conductance $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ -Kanäle (Sorensen et al. 2010) und die intermediate conductance $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ -Kanäle (Kumar et al. 2010). Auch die Stimulation apikaler Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Kanäle, die unter den gleichen Bedingungen messbar ist, ist nur in Gegenwart von mucosalem Ca^{2+} möglich; sie wird also offenkundig nur durch apikal einströmendes Ca^{2+} aktiviert (Schultheiss et al. 2005).

Die von mir durchgeführten Ussingkammerversuche, in denen eine Chloridsekretion durch Calcium-Speicher-Entleerung mit nachfolgender Ca^{2+} -Repletion ausgelöst wurde, zeigen, dass sowohl ein Einstrom von Ca^{2+} über die basolaterale Membran als auch über die apikale Membran einen Anionensekretion, gemessen als Anstieg des Kurzschlussstroms, auszulösen vermag (Abb. 7-10). Mit anderen Worten, die Translokation von STIM1 zur apikalen Membran vermag auch dort einen speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom zu induzieren, auch wenn sein Beitrag wesentlich geringer ist als derjenige über die basolaterale Membran, da deutlich höhere extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen (sprich eine höhere chemische Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom) notwendig sind, um stärkere Anstiege des Kurzschlussstroms zu induzieren.

Die sekretorische Antwort, die durch Ca^{2+} -Speicher-Entleerung und nachfolgende Repletion hervorgerufen wurde, ließ sich durch La^{3+} unterdrücken, das als Blocker des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms am Kolonepithel der Ratte (Frings et al. 1999) oder an HT29/B6-Zellen (Kerst et al. 1995) wirkt. Diese Beobachtung passt sehr gut zu der Hypothese, dass die Translokation von STIM1 zur apikalen und zur basolateralen Membran dort einen Ca^{2+} -Einstrom über speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle induziert. Denkbar wären aber auch Beiträge anderer Ca^{2+} -transportierender Enzyme. So ist bekannt, dass Orai1, das mit STIM1 zusammenarbeiten soll, auch mit einem Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher interagiert (Baryshnikov et al. 2009). Bei depolarisierten Membranpotentialen kann dieser Austauscher, der normalerweise Ca^{2+} aus der Zelle herausschafft, seine Transportrichtung umkehren und als Ca^{2+} -Beladungsenzym fungieren (Schultheiss et al. 2003).

8.4. Warum ist der kapazitative Calciueinstrom über die apikale Membran so gering?

Die Ussingkammer-Experimente zeigen, dass der kapazitative Calciueinstrom über die apikale Membran nur relativ gering ist, und das obwohl eine nennenswerte Translokation von STIM1 zur apikalen Membran stattfindet. Tatsächlich werden auf der apikalen Seite etwa zehnfach höhere Ca^{2+} -Konzentrationen benötigt, um eine der basolateralen Ca^{2+} -Repletion vergleichbare Anionensekretion hervorzurufen.

Ein Grund hierfür könnte in einer unterschiedlichen Verteilung von kanalformenden Untereinheiten für die Zusammenstellung intakter speichergesteuerter Ca^{2+} -Kanäle bestehen. Hierbei ist insbesondere an die Familie der TRP- (“transient receptor potential”) Ionenkanäle zu denken. Sie umfasst mehr als 30 Kationenkanäle, die sechs mutmaßliche Transmembran-Domänen enthalten (Abb. 8-7). Sie bilden als Homo- oder Hetero-Tetramere kationenpermeable Kanäle (Pedersen et al. 2005).

8. Diskussion

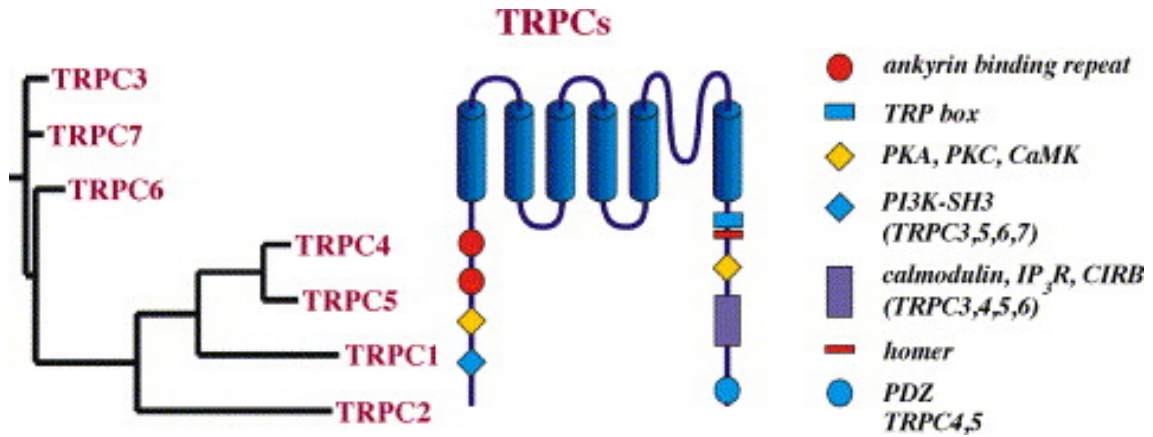


Abb. 8-7: TRPC-Familie, vorgeschlagene Membran-Topologie und mutmaßliche Kanalbestandteile mit Bedeutung für die Kanalregulation und die Interaktion mit anderen Proteinen.

Aus (Pedersen et al. 2005)

Auf der Basis von Sequenz-Homologien kann die TRP-Familie in sieben Hauptunterfamilien gegliedert werden: die TRPC ('Canonical')-Familie, die TRPV ('Vanilloid')-Familie, die TRPM ('Melastatin')-Familie, die TRPP ('Polycystin')-Familie, die TRPML ('Mucolipin')-Familie, die TRPA ('Ankyrin')-Familie und die TRPN ('NOMPC')-Familie (Pedersen et al. 2005). Säugetiere besitzen allerdings kein TRPN (Ramsey et al. 2006) (Abb.8-8).

8. Diskussion

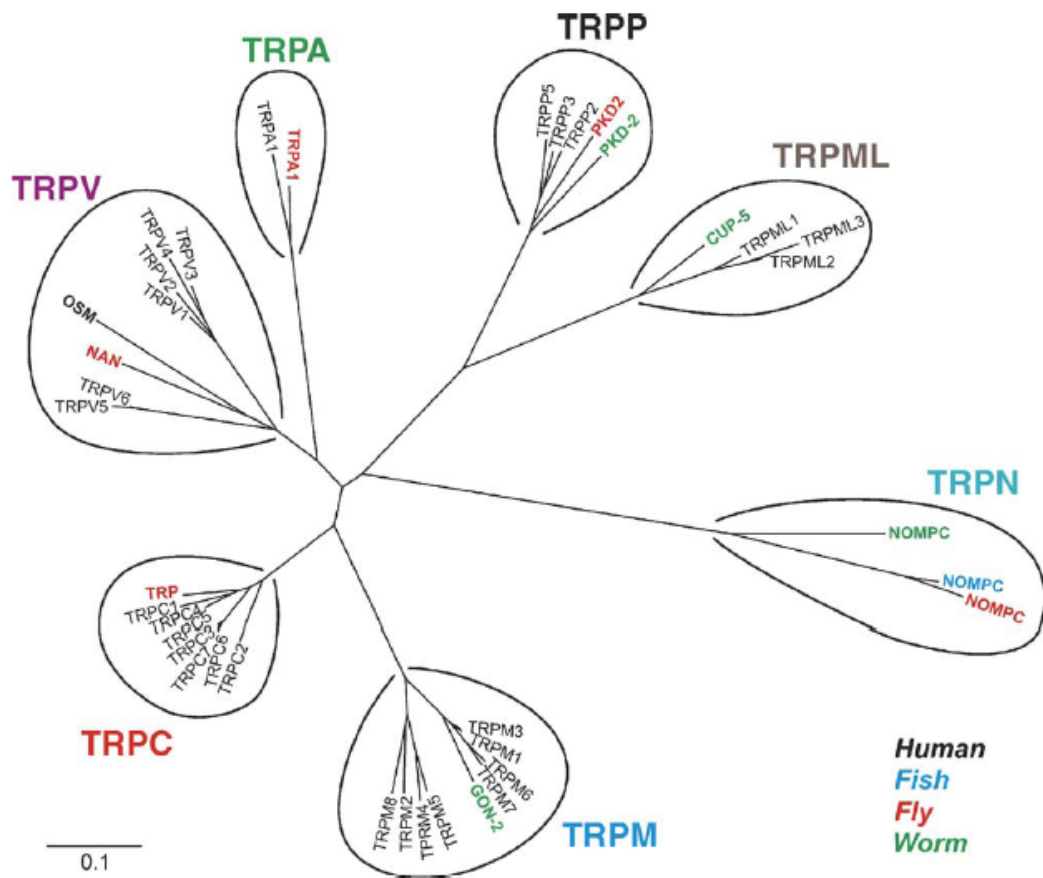


Abb.8-8: Phylogenetischer Baum der TRP-Familie.

Aus (Ramsey et al. 2006)

Säugetiere haben kein TRPN.

Die Aktivität von TRP-Kanälen wird durch eine Vielzahl von Stimuli beeinflusst. Hierzu gehören der Phosphorylierungszustand, eine Interaktion mit anderen Proteinen oder die Bindung von Liganden. Die Aktivatoren von TRP-Kanälen werden in drei größere Kategorien eingeteilt (Ramsey et al. 2006):

1. Aktivierung von Rezeptoren: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen, die die Phospholipases C aktivieren, können die TRP-Kanal-Aktivität über mindestens drei verschiedene Arten modulieren: (a) Hydrolyse von PIP_2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat), (b) Bildung von Diacylglycerol oder (c) Bildung von IP_3 und nachfolgender Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Clapham 1995). Experimentelle Evidenz liegt vor allem für die Mechanismen (a) und (b)

8. Diskussion

vor, aber viele fundamentale mechanistische Fragen sind bislang unbeantwortet.

2. Liganden-Aktivierung: Liganden, die TRP-Kanäle aktivieren, werden klassifiziert als (a) exogene kleine organische Moleküle (zum Beispiel Capsaicin, Icilin, 2-APB); (b) endogene Lipide oder Produkte aus dem Lipidstoffwechsel (Diacylglycerol, Phosphoinositide, Eikosanoide, Anandamid); (c) Purin-Nukleotide und ihre Stoffwechselprodukte wie ADP-Ribose (Adenosin-Diphosphoribose) oder βNAD^+ ; oder (d) anorganische Ionen (wie Ca^{2+} und Mg^{2+}).

3. Direkte Aktivierung: Änderungen in der Umgebungstemperatur sind beteiligt an der Öffnung von TRPV1–TRPV3 und TRPM8. Andere direkte Aktivatoren umfassen Verformung der Zellmembran oder die konformationale Kopplung an IP_3 -Rezeptoren oder die Kanalphosphorylierung (Vriens et al. 2004).

Welche TRP-Kanäle vom Kolonepithel exprimiert sind, wie ihre Verteilung in der apikalen und der basolateralen Membran aussieht und wie/ob sie mit STIM1 während des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms interagieren, bedarf weiterer Untersuchungen.

8.5. Die Rolle des Zytoskeletts bei der Translokation von STIM1

Brefeldin, eine Substanz, die den anterograden Transport von Vesikeln aus dem endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat hemmt (und gleichzeitig den Rücktransport fördert) (Misumi et al. 1986; Klausner et al. 1992), blockierte die Antwort auf basolaterale Calcium-Speicher-Wiederfüllung und verminderte den Effekt von apikaler Calcium-Speicher-Wiederfüllung (Tabellen 7-1, 7-2). Dieser letztere Effekt erreichte aber keine statistische Signifikanz, weil die Wirkung einer apikalen Calcium-Speicher-Repletion generell eine breite Variabilität aufwies. Somit scheint dem Transport zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat bei der Aktivierung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms eine wichtige Rolle zuzukommen.

Das Zytoskelett bestimmt die präzise Lokalisation und die Bewegungen von intrazellulären Proteinen (Smyth et al. 2007). Die Hauptkomponenten des Zytoskeletts sind Mikrofilamente (Aktin-Filamente), Mikrotubuli sowie Intermediärfilamente (Frixione 2000). Das Aktin-Zytoskelett besteht aus Aktin-Ketten aus F-Aktin (Schoenenberger et al. 2011) (Abb. 8-9).

8. Diskussion

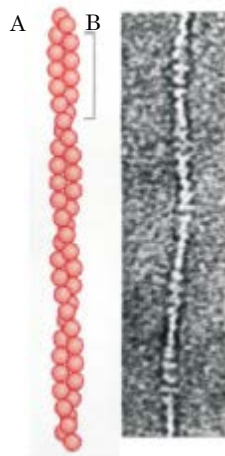


Abb. 8-9: Aktin-Filamente

(A) einfache helicale Darstellung von F-Aktin. Die globulären Untereinheiten sind als Kugeln dargestellt.

(B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von F-Aktin in der Negativfärbung.

Aus (Schoenenberger et al. 2011)

Viele Aktin-Filamente befinden sich direkt unterhalb der Plasmamembran (Charras et al. 2006; Morone et al. 2006). Diese Filamente ermöglichen die Stabilisation der äußeren Zellform (Pollard 1976; Stossel 1984), die Zellmotilität (Pantaloni et al. 2001; Carlier et al. 2003) oder Endozytose (Smythe, Ayscough 2006; Mooren et al. 2012) sowie andere Prozesse. Außerdem spielen Aktin-Filamente auch eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Zellkontakten (Gardel et al. 2010).

Mikrotubuli hingegen bestehen aus α/β -Tubulin-Heterodimeren (Wade 2009) (Abb. 8-10, a). Sie sind wesentlich für Mitose, Zellmotilität, intrazellulären Transport, Sekretion, die Erhaltung von Zellformen und die Zellpolarisation in allen eukaryotischen Zellen (Nogales 2000; Conde, Caceres 2009). Mikrotubuli sind sehr dynamische Strukturen (Conde, Caceres 2009). Der Aufbau von Mikrotubuli benötigt GTP, das an α/β -Tubulin bindet und zu GDP gespalten wird.

8. Diskussion

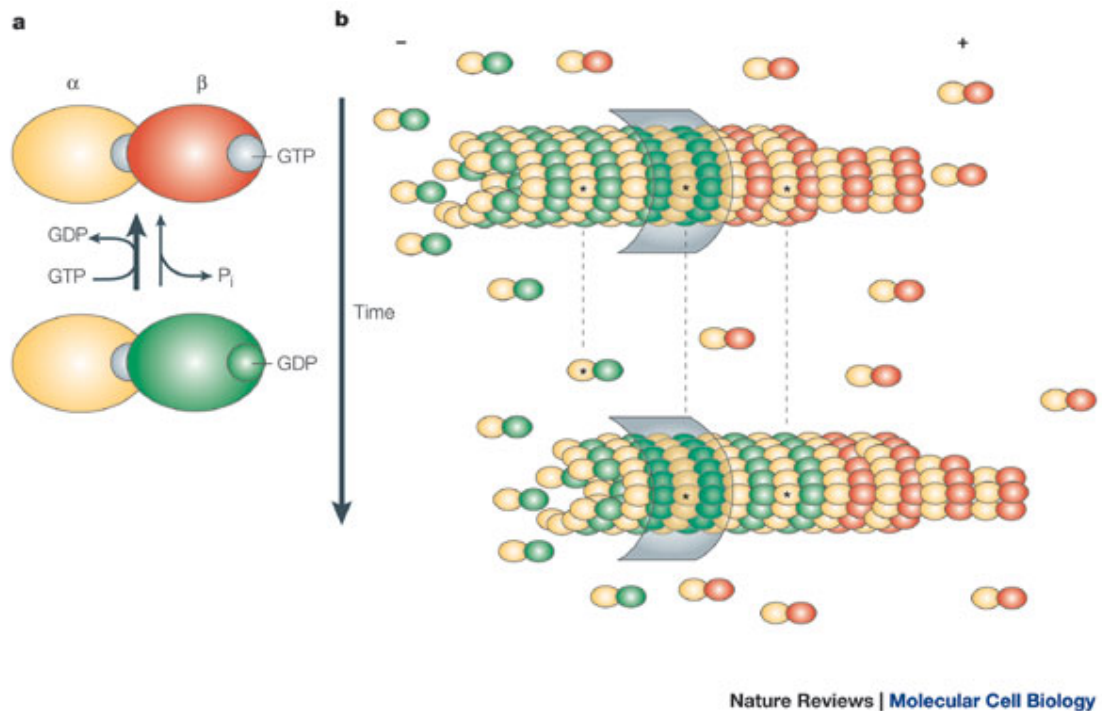


Abb. 8-10: Die Struktur des Mikrotubuli-Zytoskeletts aus α/β -Tubulin-Heterodimeren.
Aus (Galjart 2005)

Die Rolle des Zytoskeletts beim speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom ist Gegenstand intensiver Forschung. Mehrere Untersuchungen beschreiben, dass eine Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts (durch Cytochalasin) den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom nicht vermindert (Ribeiro et al. 1997; Patterson et al. 1999). An glatten Muskelzellen aus dem Meerschweinchen wurde sogar beobachtet, dass eine Störung des Zytoskeletts den Ca^{2+} -Einstrom verstärkte (Morales et al. 2005). Somit scheinen Aktinfilamente keine große Rolle bei diesem Prozess zu spielen. Ebenso wurde an anderen Zellen die mögliche Rolle von Mikrotubuli untersucht. Nocodazol, eine Substanz, die das Mikrotubuli-Zytoskelett depolymerisiert, unterdrückt den speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom in Erythrozyten (Bakowski et al. 2001), NIH 3T3-Fibroblasten (Ribeiro et al. 1997) und DT40-Zellen, einer aviären B-Lymphozyten-Zelllinie (Baba et al. 2006). Außerdem kolokalisiert STIM1 mit α -Tubulin. Allerdings wird die STIM1-Translokation nicht direkt von Mikrotubuli vermittelt (Smyth et al. 2007). Das Mikrotubuli-Zytoskelett ist als ein Hauptregulator der Struktur und der Funktion des endoplasmatischen Retikulums bekannt (Terasaki et al. 1986). Dies kann

8. Diskussion

erklären, warum ein intaktes Tubulinnetzwerk die Organisation oder die Bewegung von STIM1 direkt oder indirekt beeinflussen kann (Smyth et al. 2007)).

Am der Kolonepithel der Ratte hingegen hatte Vorbehandlung mit Colchicin keinen Effekt auf die durch Ca^{2+} -Repletion ausgelöste Anionensekretion. Ebenso unwirksam war die Stabilisation von F-Aktin mit Jasplakinolid (Tabelle 7-2). Tubulin- und Aktin-Zytoskelett scheinen also keine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms an diesen Zellen zu spielen.

8.6. siRNA-Experimente an HT29/B6-Zellen

Knock-down von STIM1 durch siRNA wurde bislang erfolgreich eingesetzt um die Beteiligung von STIM1 an Ca^{2+} -Signalwegen in HEK293-Zellen oder in der vaskulären glatten Muskulatur von Ratten (Lu et al. 2009) sowie Mäusen (Ng et al. 2010) nachzuweisen (Alicia et al. 2008). Ein ähnlicher Versuchsansatz wurde von mir gewählt, um die Beteiligung von STIM1 an rezeptorvermittelten Ca^{2+} -Signalwegen an der Kolontumorzelllinie HT29/B6-Zellen zu untersuchen. Zuerst wurden Kontrollversuche durchgeführt, um Ca^{2+} -Signalwege an dieser Zelllinie näher zu charakterisieren. In Übereinstimmung mit dem klassischen Modell, dass die Stimulation von basolateralen Muskarinrezeptoren die IP_3 -vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern auslöst, wurde der Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Hemmung der SERCA mittels Cyclopiazonsäure blockiert. Der IP_3 -Rezeptorblocker 2-APB verhinderte nur die frühe Phase der Carbachol-Antwort, nicht die Spätphase, in der der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum die Zellantwort dominiert (Tabelle 7-3). Unerwartet war die Wirkung von La^{3+} an diesen Zellen. Es ist bekannt, dass La^{3+} speichergesteuerte Kationenströme an HT29/B6-Zellen hemmt (Kerst et al. 1995). Lanthan verhinderte aber nur die frühe Phase des durch Carbachol-induzierten Anstiegs der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die späte hingegen wurde gefördert (quantifiziert 5 min nach Zugabe des cholinergen Agonisten in Tabelle 7-3). Der Grund für diesen widersprüchlichen Effekt ist letztlich unbekannt, aber Lanthan kann beispielsweise die Offenwahrscheinlichkeit von TRPC5-Kanälen steigern (Jung 2002). Im Gegensatz dazu hemmt La^{3+} am Kolonepithel der Ratte, wo Calcium-Speicher-Entleerung einen ähnlichen Lanthanid-sensitiven Kationenstrom auslöst wie an HT29/B6-Zellen (Frings et al. 1999), den Effekt der basolateralen und apikalen Ca^{2+} -Repletion (Abb. 7-11). Dies könnte also auf

8. Diskussion

unspezifische Effekte von Lanthan auf Calcium-Extrusionstransporter hinweisen oder durch Unterschiede in den Ca^{2+} -Signalwegen nach „starker“ Ca^{2+} -Speicher-Entleerung mit Calcium-freiem extrazellulärem Medium kombiniert mit SERCA-Blocker im Gegensatz zu physiologischer Rezeptor-vermittelter Stimulation von Ca^{2+} -Signalwegen zusammenhängen. Solch ein Unterschied wurde schon an 3T3-Zellen beobachtet. In diesen Zellen wurde der Ca^{2+} -Signalweg, der von Agonisten eingeleitet wurde, durch Aktin- oder Mikrotubuli-Blocker unterdrückt. Wurden Ca^{2+} -Signale hingegen direkt durch Thapsigargin oder die Injektion von IP_3 ausgelöst, war die Zellantwort gegenüber den Zytoskelett-Blockern resistent (Ribeiro et al. 1997). Eine plausible Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die die Phospholipase C aktivieren, gleichzeitig den Gehalt der Plasmamembran an PIP_2 ändern. PIP_2 ist der Vorläufer von IP_3 , das Ca^{2+} -Kanäle in intestinalen Epithelzellen aus *Caenorhabditis elegans* hemmen soll (Xing, Strange 2010). Nichtsdestoweniger hemmte die Präinkubation mit siRNA gegen STIM1 die Expression des STIM1-Proteins (Abb. 7-14) und die durch Carbachol-induzierte Zunahme der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, was die zentrale Rolle von STIM1 als Calcium-Sensor im endoplasmischen Retikulum noch einmal unterstreicht (Tabelle 7-3).

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass STIM1 an Ca^{2+} -Signalwegen im Kolonepithel beteiligt ist. Es transloziert nach Calcium-Speicher-Entleerung zur Plasmamembran um einen Ca^{2+} -Einstrom vorwiegend durch die basolaterale Membran zu induzieren. Der gleichzeitig über die apikale Membran stattfindende Ca^{2+} -Einstrom ist für die funktionelle Antwort des Gewebes, nämlich die Induktion einer Chloridsekretion, nur zweitrangig. Unterschiede in der Kinetik von Ca^{2+} -Signalen am apikalen und basolateralen Zellpol sind bekannt von Pankreas-Acinuszellen, welche hinsichtlich des Ca^{2+} -Signalings sicherlich eine der am besten charakterisierten Epitheltypen darstellen. An diesen Zellen induzieren Agonisten eine schnellere Zunahme der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration am apikalen Zellpol im Vergleich zur basolateralen Seite (Petersen, Tepikin 2008) sind. Auch sind Gradienten in der Verteilung von STIM1s in der lateralen Membran mit einer Konzentration nahe den Tight junctions und unterschiedlichen Verteilungsmuster von Orai1 und TRPC-Kanälen beschrieben (Hong et al. 2011). Zukünftige Experimente sind notwendig, um zu klären, ob solche Gradienten auch am Kolonepithel existieren und welche Rolle das andere Mitglied der STIM-Familie, STIM2, an diesen Zellen spielt.

9. Zusammenfassung

In nichterregbaren Zellen spielt der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom die wichtigste Rolle beim Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum für Ca^{2+} -abhängige Signalprozesse. Ziel der Untersuchungen war es, die Expression und die lokale Verteilung von zwei Schlüsselproteinen (STIM1 und Orai1), die in Lymphozyten und anderen Zellen als Komponenten des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms identifiziert wurden, an einem nativen Epithel, dem Kolon der Ratte, nachzuweisen. STIM1 (stromal interaction molecule 1) ist der mutmaßliche Ca^{2+} -Sensor im endoplasmatischen Retikulum und Orai1 gilt als der oder Teil des speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanals in der Plasmamembran.

Immunhistochemische Markierungen zeigten, dass beide Proteine im Kolonepithel der Ratte exprimiert werden. Qualitative Untersuchungen und morphometrische Messungen mittels eines Konfokalmikroskops ergaben, dass es nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung zu einer Translokation von STIM1 zum basolateralen und auch zum apikalen Zellpol kommt. Ein Ca^{2+} -Entleerung/Wiederfüllungs-Protokoll wurde in Ussingkammer-Experimenten eingesetzt, um die Rolle des speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms über die basolaterale und die apikale Membran zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass nicht nur basolaterale Ca^{2+} -Repletion, sondern auch apikale Ca^{2+} -Repletion eine (wenn auch schwächere) Ca^{2+} -abhängige Anionsekretion induziert. Beide Reaktionen wurden durch La^{3+} , einen Blocker nichtselektiver Kationenkanäle, unterdrückt. Der Effekt der basolateralen Ca^{2+} -Repletion wurde signifikant durch Brefeldin A gehemmt, eine Substanz, die den vesikulären Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat hemmt. In einer letzten Versuchsserie wurden mit Fura-2 aufgeladene HT29/B6-Zellen verwendet. Der durch Carbachol an diesen Zellen ausgelöste Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde signifikant gehemmt, wenn die Zellen mit siRNA gegen STIM1 vorinkubiert worden waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass STIM1 als eine Schlüsselkomponente von intrazellulären Ca^{2+} Signalwegen im Kolonepithel der Ratte exprimiert wird und nicht nur bei der Regulation des basolateralen, sondern auch des apikalen Ca^{2+} -Einstroms beteiligt ist.

10. Summary

In non-excitabile cells, store-operated Ca^{2+} entry is the most important pathway for influx of extracellular Ca^{2+} serving as second messenger in the cytoplasm. The present study aimed to investigate the expression, localization and polar distribution of two key components of store-operated Ca^{2+} entry identified e.g. in lymphocytes or epithelial cell lines, i.e. STIM1 (stromal interaction molecule 1), the presumed Ca^{2+} -sensor in the endoplasmic reticulum, and Orai1 as the (or part of the) store-operated Ca^{2+} channel in the plasma membrane, at a native intestinal epithelium, i.e. rat colon.

Immunohistochemical investigations revealed the expression of STIM1 and Orai1, and also their isoforms STIM2, Orai2, and Orai3 in the rat colonic epithelium. Ca^{2+} store depletion led to a translocation of STIM1 both to the basolateral as well as to the apical cell pole as observed by confocal microscopy. A Ca^{2+} depletion/repletion protocol was used in Ussing chamber experiments to investigate the contribution of basolateral and apical store-operated Ca^{2+} entry for the induction of anion secretion. These experiments revealed that not only basolateral Ca^{2+} repletion induced a Ca^{2+} -dependent anion secretion, but also – to a lesser extend – apical Ca^{2+} repletion. Both responses were suppressed by La^{3+} . The effect of basolateral Ca^{2+} repletion was significantly inhibited by brefeldin A, a blocker of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. In a final series of experiments, fura-2 loaded HT29/B6 cells were used. Carbachol-induced increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration was significantly reduced when the cells were pretreated with siRNA against STIM1.

In conclusion, these results demonstrate that STIM1 as a key component of intracellular Ca^{2+} signaling is expressed by rat colonic epithelium and is involved not only in regulation of basolateral but also of apical Ca^{2+} influx.

11. Abbildungsverzeichnis

11. Abbildungsverzeichnis

3. Einleitung

Nr.	Abbildung	Seite
1	Das Kryptenepithel des Kolons	11
2	Becherzellen (mit M markiert, siehe Pfeile) in einer Krypte	12
3	Schematische Darstellung der Darmschleimschicht sowie der Schleimkomponenten MUC2 sowie MUC3	13
4	Enterochromaffine Zelle (Pfeil) in der Fundusregion einer Krypte	14
5	Enterozyt (Markierung mit CC für columnar cell)	15
6	Zelluläres Modell der Verteilung von Iontentransportern an einer Kolonkrypte	16
7	Modelle für den Elektrolyt-Transport im proximalen und distalen Kolonepithel	17
8	Verschiedene Calciumtransporter in einer Zelle	20
9	IP ₃ -Signalweg	22
10	Ein Model für Aktivierung von IP ₃ -Rezeptoren	23
11	Golgi-Apparat	26
12	Modell des vesikulären Transports zwischen endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparat	27
13	Mitochondrien	29
14	Endoplasmatisches Retikulum	31
15	Ursprüngliches Modell des speichergesteuerten Ca ²⁺ -Einstroms von Putney in 1986	32
16	Verschiedene Modelle über die Mechanismen des speichergesteuerten Ca ²⁺ -Einstroms	33
17	Domänen von STIM-Proteinen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER)	36
18	Vergleich der Sequenzen von humanem STIM1 und STIM2	38
19	Struktur von drei verschiedenen Orai-Proteinen	39
20	Homomer von Orai1	41
21	Struktur von Orai1	42
22	CRAC-Kanal und ARC-Kanal	43
23	Ein Modell eines speichergesteuerten Ca ²⁺ -Kanals auf der Basis des CRAC-Kanals	45
24	Mögliche Mechanismen für die Regulation von ARC-Kanäle durch STIM1	46

11. Abbildungsverzeichnis

5. Material

Nr.	Abbildung	Seite
1	Strukturformel von Triton X-100	50
2	Strukturformel des Cy3	58
3	Strukturformel des Alexa Fluor®488	58
4	Strukturformel von Phalloidin-FITC	59
5	Strukturformel des DAPI	60
6	Strukturformel von Fura-2 AM	61
7	Strukturformel des 2-APB	62
8	Strukturformel des Colchicin	62
9	Strukturformel des Brefeldin A	63
10	Strukturformel des Carbachol	63
11	Strukturformel der Cyclopiazonsäure (CPA)	64
12	Strukturformel des Forskolin	64
13	Strukturformel des Jasplakinolide	65
14	Strukturformel des Rutheniumrot	66
15	Strukturformel des Thapsigargin	66

11. Abbildungsverzeichnis

6. Methoden

Nr.	Abbildung	Seite
1	Schematische Darstellung der Kolonwand unter Lupenvergrößerung	69
2	schematische Skizze eines Plastikhalters für Gewebe-Einbettung	72
3	Terminal Web	78
4	Prinzipieller Aufbau eines konfokalen Mikroskops	81
5	Ersatzschaltkreismodell von Ussing und Zerahn (1951) für ein Epithel	83
6	Schalbilder des (A) Opencircuits und der (B) Short-circuit Messbedingung	85
7	Schema einer modifizierte Ussingkammer	86
8	Anregungsspektren von Fura-2 bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen	89
9	Strukturformel des EGTA (A) und des (B)Fura-2	90
10	Bindung von Calcium an den Fluoreszenzindikator Fura-2 in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration	91
11	Aufbau des Calcium-Imaging-Messtands	92
12	Fura-2 AM beladene HT29/B6-Zellen nach der Markierung	94
13	Verschiedene Transfektionsmittel	95
14	Allgemeine Struktur eines kationischen Lipids	96
15	Cationic lipid reagent-mediated transfection (Lipofectamine)	96
16	Struktur der siRNA	97
17	Mechanismus der RNAi	98

11. Abbildungsverzeichnis

7. Ergebnisse

Nr.	Abbildung	Seite
1	Immunhistochemische Detektion von STIM1 in Kolon der Ratte	101
2	Immunhistochemische Detektion von STIM2 in Kolon der Ratte	102
3	Immunhistochemische Detektion von Orai1 in Kolon der Ratte	103
4	Immunhistochemische Detektion von Orai2 in Kolon der Ratte	104
5	Immunhistochemische Detektion von Orai3 in Kolon der Ratte	105
6	Lokalisation von STIM1 vor und nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung	109
7	Morphometrische Analyse der Verteilung der STIM1-Immunofluoreszenz	110
8	Morphometrische Analyse der Verteilung der Orai1-Immunofluoreszenz	111
9	Doppelmarkierung STIM1 und Aktinfilamenten	113
10	Effekte von Ca^{2+} -Speicher-Entleerung und zunehmender Ca^{2+} -Speicher-Wiederfüllung	117
11	Ca^{2+} -induzierter Isc nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung	118
12	Originaltracing der Wirkung einer Ca^{2+} -Speicher-Wiederauffüllung nach Ca^{2+} -Speicher-Entleerung an HT29/B6-Zellen	125
13	Originaltracing von Fura-2 Messungen an HT29/B6-Zellen	126
14	Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Carbachol an HT29/B6-Zellen	127
15	Immunhistochemische Färbung der HT29/B6-Zellen gegen STIM1	130
16	Analyse der zellenthaltenden Zonen der Kulturschalen	131

11. Abbildungsverzeichnis

8. Diskussion

Nr.	Abbildung	Seite
1	dynamische molekulare Kuppelung zwischen STIM1 und Orai1 in ER-PM-Junktionen	133
2	Beitrag von STIM-Isoformen zu Calcium-Homöostase in verschiedene Zellen	135
3	Struktur des TMEM16A-Proteins	138
4	Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanälen	140
5	Struktur von BK_{Ca} (big conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels)-Kanälen	142
6	Struktur von SK_{Ca} (small conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels)-Kanälen	143
7	TRPC-Familie	146
8	Phylogenetischer Baum der TRP-Familie	147
9	Aktin-Filamente	149
10	Struktur des Mikrotubuli-Zytoskeletts aus α/β -Tubulin-Heterodimeren.	150

12. Tabellenverzeichnis

12. Tabellenverzeichnis

5. Material

Nr.	Tabelle	Seite
1	Zusammensetzung des Phosphatpuffers	49
2	Zusammensetzung der Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS)	50
3	Zusammensetzung der Blocking-Lösung	51
4	Zusammensetzung der Parsons-Lösung	52
5	Zusammensetzung der Tyrode-Lösung	53
6	Zusammensetzung der Hank's BSS -Lösung	54
7	Zusammensetzung des 5×-konzentriertes siRNA Buffers	55
8	Verwendete Primär-Antikörper	56
9	Verwendete Sekundär-Antikörper	57
10	Substanzen in der Phalloidin-FITC-Lösung	59
11	Substanzen in der Kresylviolett-Färbelösung	60
12	Sequenzen der siRNA des STIM1	67

6. Methoden

Nr.	Tabelle	Seite
1	Färbeprotokoll für die einfache Fluoreszenzmarkierung	75
2	Färbeprotokoll für die Doppel-Fluoreszenzmarkierung STIM1-Orai1	76
3	Färbeprotokoll für die Doppel-Fluoreszenzmarkierung STIM1-Terminal Web	79

7. Ergebnisse

Nr.	Tabelle	Seite
1	Isc-Anstieg durch basolaterales Ca^{2+} nach Ca^{2+} -Speicherdepletion.	121
2	Isc-Anstieg durch apikales Ca^{2+} nach Ca^{2+} -Speicherdepletion	122
3	Effekt von Carbachol auf das Fura-2-Ratio-Signal an HT29/B6-Zellen	128

13. Literaturverzeichnis

- Abdullaev, I. F.; Bisailon, J. M.; Potier, M.; Gonzalez, J. C.; Motiani, R. K.; Trebak, M.** (2008): Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. In *Circulation Research* 103 (11), pp. 1289–1299.
- Adams, P. R.; Constanti, A.; Brown, D. A.; Clark, R. B.** (1982): Intracellular Ca^{2+} activates a fast voltage-sensitive K^{+} current in vertebrate sympathetic neurones. In *Nature* 296 (5859), pp. 746–749.
- Adebiyi, A.; Zhao, G.; Narayanan, D.; Thomas-Gatewood, C. M.; Bannister, J. P.; Jaggar, J. H.** (2010): Isoform-Selective Physical Coupling of TRPC3 Channels to IP3 Receptors in Smooth Muscle Cells Regulates Arterial Contractility. In *Circulation Research* 106 (10), pp. 1603–1612.
- Adelman, J. P.; Maylie, J.; Sah, P.** (2012): Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: form and function. In *Annu Rev Physiol* 74, pp. 245–269.
- Aggarwal, S. K.; MacKinnon, R.** (1996): Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K^{+} channel. In *Neuron* 16 (6), pp. 1169–1177.
- Ahmed, N.; Ramjeesingh, M.; Wong, S.; Varga, A.; Garami, E.; Bear, C. E.** (2000): Chloride channel activity of CIC-2 is modified by the actin cytoskeleton. In *Biochem J.* 352, pp. 789–794.
- Alicia, S.; Angelica, Z.; Carlos, S.; Alfonso, S.; Vaca, L.** (2008): STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts. In *Cell Calcium* 44 (5), pp. 479–491.
- Almirza, W. H. M.; Peters, P. H. J.; van Zoelen, E. J. J.; Theuvenet, A. P. R.** (2012): Role of Trpc channels, Stim1 and Orai1 in PGF(2alpha)-induced calcium signaling in RK fibroblasts. In *Cell Calcium* 51 (1), pp. 12–21.
- Anderson, M. P.; Rich, D. P.; Gregory, R. J.; Smith, A. E.; Welsh, M. J.** (1991): Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. In *Science* 251 (4994), pp. 679–682.
- Andrianifahanana, M.; Moniaux, N.; Batra, S. K.** (2006): Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. In *Biophys Acta.* 1765 (2), pp. 189–222.
- Arreola, J.; Melvin, J. E.; Begenisich, T.** (1996): Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. In *J Gen Physiol* 108 (1), pp. 35–47.

13. Literaturverzeichnis

- Avadhani, N. G.; Sangar, M. C.; Bansal, S.; Bajpai, P.** (2011): Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: the concept of chimeric signals. In *FEBS J* 278 (22), pp. 4218–4229.
- Baba, Y.** (2011): Function of store - operated calcium entry in immune cells. In *Folia Pharmacol. Jpn.* 137 (5), pp. 202–206.
- Baba, Y.; Hayashi, K.; Fujii, Y.; Mizushima, A.; Watarai, H.; Wakamori, M. ; Numaga, T.; Mori, Y.; Iino, M.; Hikida.** (2006): Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (45), pp. 16704–16709.
- Baba, Y.; Kurosaki, T.** (2008): Regulation of store-operated calcium entry by STIM1. In *Journal of Japanese Biochemical Society* 80 (12), pp. 1123–1128.
- Bakowski, D.; Glitsch, M. D.; Parekh, A. B.** (2001): An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current I(CRAC) in RBL-1 cells. In *J Physiol* 532 (Pt 1), pp. 55–71.
- Bancroft, J. D.; Gamble, M.** (2002): Theory and practice of histological techniques. 5th ed. [Edinburgh]: Churchill Livingstone.
- Barr, V. A.; Bernot, K. M.; Srikanth, S.; Gwack, Y.; Balagopalan, L.; Regan, C. K.; Helman, D. J.; Sommers, C. L.; Oh-hora, M.; Rao, A.; Samelson, L. E.** (2008): Dynamic Movement of the Calcium Sensor STIM1 and the Calcium Channel Orai1 in Activated T-Cells: Puncta and Distal Caps. In *Molecular Biology of the Cell* 19 (7), pp. 2802–2817.
- Baryshnikov, S. G.; Pulina, M. V.; Zulian, A.; Linde, C. I.; Golovina, V. A.** (2009): Orai1, a critical component of store-operated Ca^{2+} entry, is functionally associated with $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and plasma membrane Ca^{2+} pump in proliferating human arterial myocytes. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 297 (5), pp. C1103-1112.
- Bauer, M. C.; O'Connell, D.; Cahill, D. J.; Linse, S.** (2008): Calmodulin Binding to the Polybasic C-Termini of STIM Proteins Involved in Store-Operated Calcium Entry. In *Biochemistry* 47 (23), pp. 6089–6091.
- Baughman, J. M.; Perocchi, F.; Girgis, H. S.; Plovanich, M.; Belcher-Timme, C. A.; Sancak, Y.; Bao, X. R.; Strittmatter, L.; Goldberger, O.; Bogorad, R. L.; Koteliansky, V.; Mootha, V. K.** (2011): Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. In *Nature* 476 (7360), pp. 341–345.

13. Literaturverzeichnis

- Baumberger, N.** (2005): Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (33), pp. 11928–11933.
- Ben-Amor, N.; Redondo, P.C; Bartegi, A.; Pariente, J.A; Salido, G.M; Rosado, J.A** (2005): A Role for 5,6-Epoxyeicosatrienoic Acid in Calcium Entry by de novo Conformational Coupling in Human Platelets. In *The Journal of Physiology*.
- Berger, H. A.; Anderson, M. P.; Gregory, R. J.; Thompson, S.; Howard, P. W.; Maurer, R. A.; Mulligan, R.; Smith, A. E.; Welsh, M. J.** (1991): Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. In *J. Clin. Invest.* 88 (4), pp. 1422–1431.
- Berkefeld, H.; Sailer, C. A.; Bildl, W.; Rohde, V.; Thumfart, J. O.; Eble, S. et al.** (2006): BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca^{2+} -activated K^{+} signaling. In *Science* 314 (5799), pp. 615–620.
- Berna-Erro, A.; Braun, A.; Kraft, R.; Kleinschnitz, C.; Schuhmann, M. K.; Stegner, D.; Wulsch, T.; Eilers, J.; Meuth, S. G.; Stoll, G.; Nieswandt, B.** (2009): STIM2 regulates capacitive Ca^{2+} entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. In *Science Signaling [Electronic Resource]* 2 (93), pp. ra67.
- Bernstein, E.; Caudy, A. A.; Hammond, S. M.; Hannon, G. J.** (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. In *Nature* 409 (6818), pp. 363–366.
- Berridge, M. J.** (1984): Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. In *Biochem J* 220 (2), pp. 345–360.
- Berridge, M. J.** (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. In *Nature* 361 (6410), pp. 315–325.
- Berridge, M. J.** (1995): Capacitative calcium entry. In *Biochem. J.* 312, pp. 1–11.
- Berridge, M. J.** (1997): Elementary and global aspects of calcium signalling. In *J Exp Biol* 200 (Pt 2), pp. 315–319.
- Berridge, M. J.; Bootman, M. D.; Lipp, P.** (1998): Calcium - a life and death signal. In *Nature* 395 (6703), pp. 645–648.
- Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D.** (2000): The versatility and universality of calcium signalling. In *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 (1), pp. 11–21.
- Berridge, M. J.** (2004): Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. In *Biochim Biophys Acta* 1742 (1-3), pp. 3–7.

13. Literaturverzeichnis

- Bezprozvanny, I.** (2005): The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. In *Cell Calcium* 38 (3-4), pp. 261–272.
- Black, V. H.; Sanjay, A.; van Leyen, K.; Luring, B.; Kreibich, G.** (2005): Cholesterol and steroid synthesizing smooth endoplasmic reticulum of adrenocortical cells contains high levels of proteins associated with the translocation channel. In *Endocrinology* 146 (10), pp. 4234–4249.
- Blaustein, M. P.; Lederer, W. J.** (1999): Sodium/calcium exchange: its physiological implications. In *Physiol Rev* 79 (3), pp. 763–854.
- Bleich, M.; Ecke, D.; Schwartz, B.; Fraser, G.; Greger, R.** (1996): Effects of the carcinogen dimethylhydrazine (DMH) on the function of rat colonic crypts. In *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 433 (3), pp. 254–259.
- Boese, S. H.; Aziz, O.; Simmons, N. L.; Gray, M. A.** (2004): Kinetics and regulation of a Ca^{2+} -activated Cl^- conductance in mouse renal inner medullary collecting duct cells. In *Am J Physiol Renal Physiol* 286 (4), pp. F682–92.
- Böhme, M.; Diener, M.; Rummel, W.** (1991): Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. In *Pflügers Arch.* 419 (2), pp. 144–151.
- Bojarski, C.; Gitter, A. H.; Bendfeldt, K.; Mankertz, J.; Schmitz, H.; Wagner, S.; Fromm, M.; Schulzke, J. D.** (2001): Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. In *J Physiology* 535 (2), pp. 541–552.
- Bootman, M. D.; Collins, T. J.; Peppiatt, C. M.; Prothero, L. S.; Mackenzie, L.; Smet, P. de; Travers, M.; Tovey, S. C.; Seo, J. T.; Berridge, M. J.; Ciccolini, F.; Lipp, P.** (2001a): Calcium signalling - an overview. In *Semin. Cell. Dev. Biol.* 12 (1), pp. 3–10.
- Bootman, M. D.; Lipp, P.; Berridge, M. J.** (2001b): The organisation and functions of local Ca^{2+} signals. In *J. Cell. Sci.* 114 (Pt 12), pp. 2213–2222.
- Borisy, G. G.; Taylor, E.W.** (1967): The mechanism of action of colchicine: Binding of colchicine-3H to cellular protein. In *The Journal of Cell Biology* 34 (2), pp. 525–533.
- Brandman, O.; Liou, J.; Park, W. S.; Meyer, T.** (2007): STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels. In *Cell* 131 (7), pp. 1327–1339.
- Brenner, R.; Jegla, T.J.; Wickenden, A.; Liu, Y.; Aldrich, R.W.** (2000): Cloning and Functional Characterization of Novel Large Conductance Calcium-activated Potassium Channel beta Subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. In *Journal of Biological Chemistry* 275 (9),

13. Literaturverzeichnis

pp. 6453–6461.

Brighton, C. T.; Hunt, R. M. (1974): Mitochondrial calcium and its role in calcification.

Histochemical localization of calcium in electron micrographs of the epiphyseal growth plate with K-pyroantimonate. In *Clin Orthop Relat Res* (100), pp. 406–416.

Brini, M.; Carafoli, E. (2000): Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. In *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57 (3), pp. 354–370.

Brini, M.; Pinton, P.; Pozzan, T.; Rizzuto, R. (1999): Targeted recombinant aequorins: Tools for monitoring Ca^{2+} in the various compartments of a living cell. In *Microsc. Res. Techniq.* 46 (6), pp. 380–389.

Broegger Christensen, S.; Kjoeller Larsen, I.; Rasmussen, U.; Christophersen, C.

(1982): Thapsigargin and thapsigarginin, two histamine liberating sesquiterpene lactones from *Thapsia garganica*. X-ray analysis of the 7,11-epoxide of thapsigargin. In *J. Org. Chem.* 47 (4), pp. 649–652.

Bubb, M. R.; Spector, I.; Beyer, B. B.; Fosen, K. M. (2000): Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. In *J Biol Chem* 275 (7), pp. 5163–5170.

Bubb, M.R.; Senderowicz, A.M.J; Sausville, E. A.; Duncan, K. L.; Korn, E. D. (1994): Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. In *Journal of Biological Chemistry* 269 (21), pp. 14869–14871.

Bülbring, E.; Gershon, M. D. (1967): 5-hydroxytryptamine participation in the vagal inhibitory innervation of the stomach. In *Journal of Physiology* 192 (3), pp. 823–846.

Cahalan, M. D. (2009): STIMulating store-operated Ca^{2+} entry. In *Nature Cell Biology* 11 (6), pp. 669–677.

Cahalan, M. D.; Zhang, S. L.; Yeromin, A. V.; Ohlsen, K.; Roos, J.; Stauderman, K. A. (2007): Molecular basis of the CRAC channel. In *Cell Calcium* 42 (2), pp. 133–144.

Cai, X.; Cookson, M. (2007): Molecular Evolution and Functional Divergence of the Ca^{2+} Sensor Protein in Store-operated Ca^{2+} Entry: Stromal Interaction Molecule. In *PLOS ONE* 2 (7), pp. e609.

Capiod, T. (2011): Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. In *Biochimie* 93 (12), pp. 2075–2079.

Carrasco, S.; Meyer, T. (2011): STIM Proteins and the Endoplasmic Reticulum-Plasma

13. Literaturverzeichnis

- Membrane Junctions. In *Annu. Rev. Biochem.* 80 (1), pp. 973–1000.
- Cartwright, E. J.; Oceandy, D.; Austin, C.; Neyses, L.** (2011): Ca^{2+} signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps. In *Sci. China Life Sci.* 54 (8), pp. 691–698.
- Cavalli, A. L.; O'Brien, N. W.; Barlow, S. B.; Betto, R.; Glembotski, C. C.; Palade, P. T.; Sabbadini, R. A.** (2003): Expression and functional characterization of SCaMPER: a sphingolipid-modulated calcium channel of cardiomyocytes. In *Am J Physiol Cell Physiol* 284 (3), pp. C780-90.
- Cerutti, H.; Casas-Mollano, J. A.** (2006): On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. In *Curr Genet* 50 (2), pp. 81–99.
- Chandra, S.; Kable, E. P.; Morrison, G. H.; Webb, W. W.** (1991): Calcium sequestration in the Golgi apparatus of cultured mammalian cells revealed by laser scanning confocal microscopy and ion microscopy. In *J. Cell. Sci.* 100 (Pt 4), pp. 747–752.
- Chang, W. W.; Leblond, C. P.** (1971): Renewal of the epithelium in the descending colon of the mouse. I. Presence of three cell populations: vacuolated-columnar, mucous and argentaffin. In *American Journal of Anatomy* 131 (1), pp. 73–99.
- Charras, G. T.; Hu, C.-K.; Coughlin, M.; Mitchison, T. J.** (2006): Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. In *The Journal of Cell Biology* 175 (3), pp. 477–490.
- Chen, T.R.; Drabkowski, D.; Hay, R.J.; Macy, M.; Peterson, W.** (1987): WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. In *Cancer Genet Cytogenet.* 27 (1), pp. 125–134.
- Chi, Y. H.; Chen, Z. J.; Jeang, K. T.** (2009): The nuclear envelopathies and human diseases. In *J Biomed Sci* 16 (1), p. 96.
- Chin, D.; Means, A. R.** (2000): Calmodulin: a prototypical calcium sensor. In *Trends cell biol.* 10 (8), pp. 322–328.
- Clapham, D. E.** (1995): Calcium signaling. In *Cell* 80 (2), pp. 259–268.
- Conde, C.; Caceres, A.** (2009): Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. In *Nat Rev Neurosci* 10 (5), pp. 319–332.
- Coonrod, A.; Li, F. Q.; Horwitz, M.** (1997): On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. In *Gene Ther* 4 (12), pp. 1313–1321.
- Coons, A. H.** (1958): Fluorescent antibody methods. In *Gen Cytochem Methods* 1, pp. 399–422.
- Coons, A. H.; Creech, H. J.; Jones, R. N.** (1941): Immunological Properties of an

13. Literaturverzeichnis

- Antibody Containing a Fluorescent Group. In *Exp Biol Med* 47 (2), pp. 200–202.
- Cooper, J. A.** (1987): Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. In *J Cell Biol* 105 (4), pp. 1473–1478.
- Cox, D. H.** (2011): Ca^{2+} -regulated ion channels. In *BMB Rep* 44 (10), pp. 635–646.
- Csutora, P.; Su, Z.; Kim, H. Y.; Bugrim, A.; Cunningham, K. W.; Nuccitelli, R.; Keizer, J. E.; Hanley, M. R.; Blalock, J. E.; Marchase, R. B.** (1999): Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (1), pp. 121–126.
- Csutora, P.; Zarayskiy, V.; Peter, K.; Monje, F.; Smani, T.; Zakharov, S. I. et al.** (2006): Activation Mechanism for CRAC Current and Store-operated Ca^{2+} Entry: Calcium influx factor and Ca^{2+} -independent phospholipase A2 β -mediated pathway. In *Journal of Biological Chemistry* 281 (46), pp. 34926–34935.
- Dapson, R. W.** (1993): Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments. In *Biotechnic & Histochemistry* 68 (2), pp. 75–82.
- Dean, M.; Hamon, Y.; Chimini, G.** (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. In *Journal of Lipid Research* 42 (7), pp. 1007–1017.
- DeHaven, W. I.; Smyth, J. T.; Boyles, R. R.; Putney, J. W.** (2007): Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels. In *Journal of Biological Chemistry* 282 (24), pp. 17548–17556.
- Deng, X.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Soboloff, J.; Gill, D. L.** (2009): STIM and Orai: Dynamic Intermembrane Coupling to Control Cellular Calcium Signals. In *Journal of Biological Chemistry* 284 (34), pp. 22501–22505.
- Denk, W.; Strickler, J.; Webb, W.** (1990): Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. In *Science* 248 (4951), pp. 73–76.
- Dharmani, P.; Srivastava, V.; Kissoon-Singh, V.; Chadee, K.** (2009): Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. In *Journal of Innate Immunity* 1 (2), pp. 123–135.
- Diener, M.; Rummel, W.** (1989): Actions of the Cl^- channel blocker NPPB on absorptive and secretory transport processes of Na^+ and Cl^- in rat descending colon. In *Acta Physiologica Scandinavica* 137 (2), pp. 215–222.
- Douglas, W. W.; Poisner, A. M.** (1963): The influence of calcium on the secretory response of the submaxillary gland to acetylcholine or to noradrenaline. In *J Physiol* 165 (3), pp.

13. Literaturverzeichnis

528–541.

- Drenckhahn, D.** (1988): Organization of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. In *The Journal of Cell Biology* 107 (3), pp. 1037–1048.
- Duchen, M.R.** (1999): Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *The Journal of physiology* 516 (pt 1), pp. 1 – 17.
- Duchen, M. R.** (2000): Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of physiology* 529 (pt 1), pp. 57 – 68.
- Dunphy, W. G.; Rothman, J. E.** (1985): Compartmental organization of the Golgi stack. In *Cell* 42 (1), pp. 13–21.
- Dziadek, M. A.; Johnstone, L. S.** (2007): Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. In *Cell Calcium* 42 (2), pp. 123–132.
- Ebashi, S.; Endo, M.** (1968): Calcium and muscle contraction. In *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 18, pp. 123–183.
- Ecke, D.; Bleich, M.; Greger, R.** (1996a): The amiloride inhibitable Na^+ conductance of rat colonic crypt cells is suppressed by forskolin. In *Pflügers Arch.* 431 (6), pp. 984–986.
- Ecke, D.; Bleich, M.; Schwartz, B.; Fraser, G.; Greger, R.** (1996b): The ion conductances of colonic crypts from dexamethasone-treated rats. In *Pflügers Arch.* 431 (3), pp. 419–426.
- Edgerton, J. R.; Reinhart, P. H.** (2003): Distinct contributions of small and large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels to rat Purkinje neuron function. In *The Journal of Physiology* 548 (1), pp. 53–69.
- Eggermont, J.** (2004): Calcium-activated chloride channels: (un)known, (un)loved? In *Proc Am Thorac Soc* 1 (1), pp. 22–27.
- El, Boustany C.; Katsogiannou, M.; Delcourt, P.; Dewailly, E.; Prevarskaya, N.; Borowiec, A. S.; Capiod, T.** (2010): Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells. In *Cell Calcium* 47 (4), pp. 350–359.
- Eltoum, I.; Fredenburgh, J.; Myers, R. B.; Grizzle, W. E.** (2001): Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. In *Journal of Histotechnology* 24 (3), pp. 173–190.
- Endo, T.** (2008): Protein Traffic at the Mitochondrial Membranes. In *Biophys.* 48 (1), pp. 4–10.
- Erspamer, V.; Asero, B.** (1952): Identification of Enteramine, the Specific Hormone of the

13. Literaturverzeichnis

- Enterochromaffin Cell System, as 5-Hydroxytryptamine. In *Nature* 169 (4306), pp. 800–801.
- Fabene, P. F.; Bentivoglio, M.** (1998): 1898-1998: Camillo Golgi and "the Golgi": One hundred years of terminological clones. In *Brain Res. Bull.* 47 (3), pp. 195–198.
- Faber, L. E. S.** (2009): Functions and Modulation of Neuronal SK Channels. In *Cell Biochem Biophys* 55 (3), pp. 127–139.
- Fahrner, M.; Muik, M.; Derler, I.; Schindl, R.; Fritsch, R.; Frischauf, I.; Romanin, C.** (2009): Mechanistic view on domains mediating STIM1-Orai coupling. In *Immunol. Rev.* 231 (1), pp. 99–112.
- Faultsch, H.; Zobeley, S.; Rinnerthaler, G.; Small, J. V.** (1988): Fluorescent phallotoxins as probes for filamentous actin. In *J Muscle Res Cell Motil* 9 (5), pp. 370–383.
- Ferrera, L.; Caputo, A.; Galletta, L. J. V.** (2010): TMEM16A protein: a new identity for Ca^{2+} -dependent Cl^- channels. In *Physiology* 25 (6), pp. 357–363.
- Feske, S.** (2011): Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry. In *Annals of the New York Academy of Sciences* 1238 (1), pp. 74–90.
- Fire, A.; Xu, S.Q.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C.** (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In *Nature* 391 (6669), pp. 806–811.
- Flourakis, M.; Lehen'kyi, V.; Beck, B.; Raphaël, M.; Vandenberghe, M.; Abeele, F. V.; Roudbaraki, M.; Lepage, G.; Mauroy, B.; Romanin, C.; Shuba, Y.; Skryma, R.; Prevarskaya, N.** (2010): Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. In *Cell. Death. Dis.* 1 (9), pp. e75.
- Fougerolles, A. de; Vornlocher, H.; Maraganore, J.; Lieberman, J.** (2007): Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. In *Nat. Rev. Drug. Discov.* 6 (6), pp. 443–453.
- Fraley, R.; Subramani, S.; Berg, P.; Papahadjopoulos, D. D.** (1980): Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. In *J Biol Chem.* 255 (21), pp. 431–435.
- Friedman, J. R.; Webster, B. M.; Mastronarde, D. N.; Verhey, K. J.; Voeltz, G. K.** (2010): ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. In *J Cell Biol* 190 (3), pp. 363–375.
- Frings, M.; Schultheiß, G.; Diener, M.** (1999): Electrogenic Ca^{2+} entry in the rat colonic epithelium. In *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 439 (1-2), pp. 39–48.

13. Literaturverzeichnis

- Frings, S.; Reuter, D.; Kleene, S. J.** (2000): Neuronal Ca^{2+} -activated Cl^- channels--homing in on an elusive channel species. In *Progress in Neurobiology* 60 (3), pp. 247–289.
- Frischauf, I.; Schindl, R.; Bergsmann, J.; Derler, I.; Fahrner, M.; Muik, M.; Fritsch, R.; Lackner, B.; Groschner, K.; Romanin, C.** (2011): Cooperativeness of Orai cytosolic domains tunes subtype-specific gating. In *J Biol Chem* 286 (10), pp. 8577–8584.
- Frischauf, I.; Schindl, R.; Derler, I.; Bergsmann, J.; Fahrner, M.; Romanin, C.** (2008): The STIM/Orai coupling machinery. In *Channels* 2 (4), pp. 261–268.
- Frixione, E.** (2000): Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. In *Cell Motil Cytoskeleton* 46 (2), pp. 73–94.
- Furubayashi, R.; Sato, E.; Ishibashi, T.** (1978): Appearance and Distribution of Enterochromaffin Cells in Rat Intestine. In *Jour. Zootech. Jpn.* 49 (6), pp. 461–461.
- Gaietta, L. J. V.** (2009): The TMEM16 protein family: a new class of chloride channels? In *Biophys. J.* 97 (12), pp. 3047–3053.
- Gallione, A.** (1994): Cyclic ADP-ribose, the ADP-ribosyl cyclase pathway and calcium signalling. In *Mol Cell Endocrinol* 98 (2), pp. 125–131.
- Galjart, N.** (2005): CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. In *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (6), pp. 487–498.
- Gardel, M. L.; Schneider, I. C.; Aratyn-Schaus, Y.; Waterman, C. M.** (2010): Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. In *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, pp. 315–333.
- Gareis, M.; Harrer, P.; Bertling, W. M.** (1991): Homologous recombination of exogenous DNA fragments with genomic DNA in somatic cells of mice. In *Cell Mol Biol* 37 (2), pp. 191–203.
- Gélébart, P.; Kovács, T.; Brouland, J. P.; van Gorp, R.; Grossmann, J.; Rivard, N.; Panis, Y.; Martin, V.; Bredoux, R.; Enouf, J.; Papp, B.** (2002): Expression of Endomembrane Calcium Pumps in Colon and Gastric Cancer Cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. In *Journal of Biological Chemistry* 277 (29), pp. 26310–26320.
- Gershon, H.; Ghirlando, R.; Guttman, S. B.; Minsky, A.** (1993): Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. In *Biochemistry* 32 (28), pp. 7143–7151.
- Ghatta, S.; Nimmagadda, D.; Xu, X.; O'Rourke, S. T.** (2006): Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. In *Pharmacol*

13. Literaturverzeichnis

- Ther* 110 (1), pp. 103–116.
- Glick, B. S.; Malhotra, V.** (1998): The curious status of the Golgi apparatus. In *Cell* 95 (7), pp. 883–889.
- Goeger, D. E.; Riley, R. T.; Dorner, J. W.; Cole, R. J.** (1988): Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca^{2+} -transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. In *Biochem Pharmacol.* 37 (5), pp. 978–981.
- Golding, N. L.; Jung, H. Y.; Mickus, T.; Spruston, N.** (1999): Dendritic calcium spike initiation and repolarization are controlled by distinct potassium channel subtypes in CA1 pyramidal neurons. In *Journal of Neuroscience* 19 (20), pp. 8789–8798.
- Graham, S. J.; Dziadek, M. A.; Johnstone, L. S.** (2011): A cytosolic STIM2 preprotein created by signal peptide inefficiency activates ORAI1 in a store-independent manner. In *Journal of Biological Chemistry* 286 (18), pp. 16174–16185.
- Gravina, F. S.; Parkington, H. C.; Kerr, K. P.; Oliveira, R. B. de; Jobling, P.; Coleman, H. A.; Sandow, S. L.; Davies, M. M.; Imtiaz, M. S.; van Helden, D. F.** (2010): Role of mitochondria in contraction and pacemaking in the mouse uterus. In *British Journal of Pharmacology* 161 (6), pp. 1375–1390.
- Grigoriev, I.; Gouveia, S. M.; van der Vaart B; Demmers, J.; Smyth, J. T.; Honnappa, S.; Splinter, D.; Steinmetz, M. O.; Putney, J. W.; Hoogenraad, C. C.; Akhmanova, A.** (2008): STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. In *Current Biology* 18 (3), pp. 177–182.
- Gruszczynska-Biegala, J.; Pomorski, P.; Wisniewska, M. B.; Kuznicki, J.** (2011): Differential roles for STIM1 and STIM2 in store-operated calcium entry in rat neurons. In *PLoS ONE* 6 (4), pp. e19285.
- Gryniewicz G.; Poenie M.; Tsien R.Y.** (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. In *J Biol Chem.* 260 (6), pp. 3440–3450.
- Guse, A. H.; Lee, H. C.** (2008): NAADP: a universal Ca^{2+} trigger. In *Science Signaling* 1 (44), pp. re10.
- Gwack, Y.; Srikanth, S.; Feske, S.; Cruz-Guilloty, F.; Oh-hora, M.; Neems, D. S.; Hogan, P. G.; Rao, A.** (2007): Biochemical and functional characterization of Orai proteins. In *Journal of Biological Chemistry* 282 (22), pp. 16232–16243.
- Hajnóczky, G.; Csordas, G.; Madesh, M.; Pacher, P.** (2000): The machinery of local Ca^{2+} signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. In *J Physiology* 529 (1),

13. Literaturverzeichnis

- pp. 69–81.
- Hallman, T. M.; Peng, M.; Meade, R.; Hancock, W. W.; Madaio, M. P.; Gasser, D. L.** (2006): The mitochondrial and kidney disease phenotypes of kd/kd mice under germfree conditions. In *J Autoimmun* 26 (1), pp. 1–6.
- Hammond, S. M.** (2001): Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. In *Science* 293 (5532), pp. 1146–1150.
- Hanks J.H.; Wallace, R.E.** (1949): Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. In *Proc Soc Exp Biol Med.* 71 (2), pp. 196–200.
- Harper, M. T.; Mason, M. J.; Sage, S. O.; Harper, A. G. S.** (2010): Phorbol ester-evoked Ca^{2+} signaling in human platelets is via autocrine activation of P(2X1) receptors, not a novel non-capacitative Ca^{2+} entry. In *J Thromb Haemost* 8 (7), pp. 1604–1613.
- Hartzell, C.; Putzier, I.; Arreola, J.** (2005): Calcium-activated chloride channels. In *Annu Rev Physiol* 67, pp. 719–758.
- Hayat, M. A.** (2002): Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods: for light and electron microscopy. In *Kluwer Academic*, pp. 71–93.
- He, W.; Hu, Z.** (2012): The Role of the Golgi-Resident SPCA $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ Pump in Ionic Homeostasis and Neural Function. In *Neurochem. Res.* 37 (3), pp. 455–468.
- Hennig, B.; Schultheiss, G.; Kunzelmann, K.; Diener, M.** (2008): Ca^{2+} -Induced Cl^{-} Efflux at Rat Distal Colonic Epithelium. In *J Membrane Biol* 221 (2), pp. 61–72.
- Hermiston, M. L.; Gordon, J. I.** (1995): Organization of the crypt-villus axis and evolution of its stem cell hierarchy during intestinal development. In *American Journal of Physiology* 268 (5 Pt 1), pp. G813–822.
- Higgins, C. F.** (1992): ABC Transporters: From Microorganisms to Man. In *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8 (1), pp. 67–113.
- Ho, S. B.** (1992): Cytoskeleton and other differentiation markers in the colon. In *J Cell Biochem Suppl* 16, pp. 119–128.
- Hogan, P. G.; Lewis, R. S.; Rao, A.** (2010): Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. In *Annual Review of Immunology* 28, pp. 491–533.
- Hollingsworth, M. A.; Swanson, B. J.** (2004): Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. In *Nat. Rev. Cancer* 4 (1), pp. 45–60.
- Holzapfel, C. W.** (1968): The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. In *Tetrahedron* 24 (5), pp. 2101–2119.

13. Literaturverzeichnis

- Horster, M.; Fabritius, J.; Büttner, M.; Maul, R.; Weckwerth, P.** (1994): Colonic-crypt-derived epithelia express induced ion transport differentiation in monolayer cultures on permeable matrix substrata. In *Pflügers Arch.* 426 (1-2), pp. 110–120.
- Hull, B. E.; Staehelin, L. A.** (1979): The terminal web. A reevaluation of its structure and function. In *Journal of Cell Biology* 81 (1), pp. 67–82.
- Ichas, F.; Jouaville, L. S.; Mazat, J. P.** (1997): Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. In *Cell* 89 (7), pp. 1145–1153.
- Iino, M.** (1990): Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. In *J. Gen. Physiol* 95 (6), pp. 1103–1122.
- Inesi, G.; Hua, S.; Xu, C.; Ma, H.; Seth, M.; Prasad, A. M.; Sumbilla, C.** (2005): Studies of Ca^{2+} ATPase (SERCA) Inhibition. In *J Bioenerg Biomembr* 37 (6), pp. 365–368.
- Ishida, H.** (2004): The research method for investigating the role of the mitochondrial permeability transition pore in cell death. In *Folia Pharmacol. Jpn.* 123 (5), pp. 329–334.
- Ishii, T. M.; Silvia, C.; Hirschberg, B.; Bond, C. T.; Adelman, J. P.; Maylie, J.** (1997): A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. In *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (21), pp. 11651–11656.
- Jaconi, M. E.; Lew, D. P.; Monod, A.; Krause, K. H.** (1993): The regulation of store-dependent Ca^{2+} influx in HL-60 granulocytes involves GTP-sensitive elements. In *Journal of Biological Chemistry* 268 (35), pp. 26075–26078.
- Janeway, Charles; Murphy, Kenneth P.** (2009): Janeway Immunologie. 7th ed. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Ji, W.; Xu, P.; Li, Z.; Lu, J.; Liu, L.; Zhan, Y.; Chen, Y.; Hille, B.; Xu, T.; Chen, L.** (2008): Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (36), pp. 13668–13673.
- Joiner, W. J.; Wang, L.-Y.; Tang, M. D.; Kaczmarek, L. K.** (1997): hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (20), pp. 11013–11018.
- Joseph, S. K.; Thomas, A. P.; Williams, R. J.; Irvine, R. F.; Williamson, J. R.** (1984): myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate. A second messenger for the hormonal mobilization of

13. Literaturverzeichnis

- intracellular Ca^{2+} in liver. In *J Biol Chem* 259 (5), pp. 3077–3081.
- Jung, S.** (2002): Lanthanides Potentiate TRPC5 Currents by an Action at Extracellular Sites Close to the Pore Mouth. In *Journal of Biological Chemistry* 278 (6), pp. 3562–3571.
- Karaki, S.; Kuwahara, A.** (2004): Electrophysiological measurement of transepithelial ion transport: short-circuit current (Ussing chamber) technique. In *Folia Pharmacol. Jpn.* 123 (3), pp. 211–218.
- Kavitha, C.; Rajamani K.; Vadivel, E.** (2010): *Coleus forskohlii* – A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. In *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (4), pp. 278–285.
- Kawamoto, E. M.; Vivar, C.; Camandola, S.** (2012): Physiology and Pathology of Calcium Signaling in the Brain. In *Front. Pharmacol.* 3.
- Kerst, G.; Fischer, K. G.; Normann, C.; Kramer, A.; Leipziger, J.; Greger, R.** (1995): Ca^{2+} influx induced by store release and cytosolic Ca^{2+} chelation in HT29 colonic carcinoma cells. In *Pflugers Arch.* 430 (5), pp. 653–665.
- Kim, S.; Lakhani, V.; Costa, D. J.; Sharara, A. I.; Fitz, J. G.; Huang, L. W.; Peters, K. G.; Kindman, L. A.** (1995): Sphingolipid-gated Ca^{2+} release from intracellular stores of endothelial cells is mediated by a novel Ca^{2+} -permeable channel. In *J Biol Chem* 270 (10), pp. 5266–5269.
- Kim, Y. S.; Ho, S. B.** (2010): Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. In *Curr Gastroenterol Rep* 12 (5), pp. 319–330.
- Kim, M. S.; Hong, J. H.; Li, Q.; Shin, D. M.; Abramowitz, J.; Birnbaumer, L.; Muallem, S.** (2009): Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca^{2+} influx and the severity of acute pancreatitis. In *Gastroenterology*. 137 (4), pp. 1509–1517.
- Kirichok, Y.; Krapivinsky, G.; Clapham, D. E.** (2004): The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. In *Nature* 427 (6972), pp. 360–364.
- Klausner, R. D.; Donaldson, J. G.; Lippincott-Schwartz, J.** (1992): Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. In *J Cell Biol* 116 (5), pp. 1071–1080.
- Kockerling, A.; Sorgenfrei, D.; Fromm, M.** (1993): Electrogenic Na^{+} absorption of rat distal colon is confined to surface epithelium: a voltage-scanning study. In *American Journal of Physiology* 264 (5 Pt 1), pp. C1285–1293.

13. Literaturverzeichnis

- Köhler, M.; Hirschberg, B.; Bond, C. T.; Kinzie, J. M.; Marrion, N. V.; Maylie, J.; Adelman, J. P.** (1996): Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. In *Science* 273 (5282), pp. 1709–1714.
- Kokoska, E. R.; Smith, G. S.; Miller, T. A.** (1998): Store-operated calcium influx in human gastric cells: role of endogenous prostaglandins. In *Surgery* 124 (2), pp. 429–437.
- Konno, M.; Shirakawa, H.; Miyake, T.; Sakimoto, S.; Nakagawa, T.; Kaneko, S.** (2012): Calumin, a Ca^{2+} -binding protein on the endoplasmic reticulum, alters the ion permeability of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels. In *Biochem Biophys Res Commun* 417 (2), pp. 784–789.
- Kubista, M.; Akerman, B.; Norden, B.** (1987): Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. In *Biochemistry* 26 (14), pp. 4545–4553.
- Kumar, N. S. N.; Singh, S. K.; Rajendran, V. M.** (2010): Mucosal potassium efflux mediated via Kcnn4 channels provides the driving force for electrogenic anion secretion in colon. In *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299 (3), pp. G707–G714.
- Kunzelmann, K.; Mall, M.** (2002): Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and implications for disease. In *Physiol Rev* 82 (1), pp. 245–289.
- Kuramoto, H.; Kadowaki, M.; Sakamoto, H.; Yuasa, K.; Todo, A.; Shirai, R.** (2007): Distinct morphology of serotonin-containing enterochromaffin (EC) cells in the rat distal colon. In *Arch Histol Cytol* 70 (4), pp. 235–241.
- Kurosaki, T.; Baba, Y.** (2010): Ca^{2+} signaling and STIM1. In *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 103 (1), pp. 51–58.
- Lancaster, B.; Nicoll, R. A.** (1987): Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. In *Journal of Physiology* 389, pp. 187–203.
- Lange, Y.; Ye, J.; Rigney, M.; Steck, T. L.** (1999): Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. In *J Lipid Res* 40 (12), pp. 2264–2270.
- Larsson, L. I.** (1988): Immunocytochemistry. Theory and practice. Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Lebiedzinska, M.; Szabadkai, G.; Jones, A. W. E.; Duszynski, J.; Wieckowski, M. R.** (2009): Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. In *Int J Biochem Cell Biol* 41 (10), pp. 1805–1816.
- Lee, K. P.; Yuan, J. P.; Hong, J. H.; So, I.; Worley, P. F.; Muallem, S.** (2010): An

13. Literaturverzeichnis

- endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs. In *FEBS Letters* 584 (10), pp. 2022–2027.
- Lee, U. S.; Cui, J.** (2010): BK channel activation: structural and functional insights. In *Trends Neurosci* 33 (9), pp. 415–423.
- Leite, M. F.; Burgstahler, A. D.; Nathanson, M. H.** (2002): Ca^{2+} waves require sequential activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors in pancreatic acini. In *Gastroenterology* 122 (2), pp. 415–427.
- Li, T.; Brustovetsky, T.; Antonsson, B.; Brustovetsky, N.** (2008): Oligomeric BAX induces mitochondrial permeability transition and complete cytochrome c release without oxidative stress. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777 (11), pp. 1409–1421.
- Li, Z.; Lu, J.; Xu, P.; Xie, X.; Chen, L.; Xu, T.** (2007): Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activation. In *Journal of Biological Chemistry* 282 (40), pp. 29448–29456.
- Lievins-Le Moal, V.; Servin, A. L.** (2006): The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. In *Clinical Microbiology Reviews* 19 (2), pp. 315–337.
- Lin, P.; Yao, Y.; Hofmeister, R.; Tsien, R.Y.; Farquhar, M.G.** (1999): Overexpression of CALNIN (Nucleobindin) Increases Agonist and Thapsigargin Releasable Ca^{2+} Storage in the Golgi. In *The Journal of Cell Biology* 145 (2), pp. 279–289.
- Lindstrom, C. G.; Rosengren, J. E.; Fork, F. T.** (1979): Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. In *Acta Radiologica: Diagnosis* 20 (3), pp. 523–536.
- Liou, J.; Kim, M. L.; Heo, W. D.; Jones, J. T.; Myers, J. W.; Ferrell, J. E.; Meyer, T.** (2005): STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. In *Current Biology* 15 (13), pp. 1235–1241.
- Liu, J.; Carmell M.A.; Rivas F.V.; Marsden C.G.; Thomson J.M.; Song J.J.; Hammond S.M.; Joshua-Tor L.; Hannon G.J.** (2004): Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. In *Science* 305 (5689), pp. 1437–1441.
- Liu, J.; Zheng, Q.; Deng, Y.; Cheng, C.-S.; Kallenbach, N. R.; Lu, M.** (2006): A seven-helix coiled coil. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (42), pp. 15457–15462.
- López, E.; Salido, G. M.; Rosado, J. A.; Berna-Erro, A.** (2012): Unraveling STIM2 function. In *J Physiol Biochem*.

13. Literaturverzeichnis

- Lu, W.; Wang, J.; Peng, G.; La Shimoda; Sylvester, J. T.** (2009): Knockdown of stromal interaction molecule 1 attenuates store-operated Ca^{2+} entry and Ca^{2+} responses to acute hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. In *American Journal of Physiology - Lung Cellular & Molecular Physiology* 297 (1), pp. L17-25.
- Luik, R. M.; Wang, B.; Prakriya, M.; Wu, M. M.; Lewis, R. S.** (2008): Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. In *Nature* 454 (7203), pp. 538–542.
- Lynen, F.; Wieland, U.** (1938): Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. IV. In *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 533 (1), pp. 93–117.
- Maeda, N.; Kawasaki, T.; Nakade, S.; Yokota, N.; Taguchi, T.; Kasai, M.; Mikoshiba, K.** (1991): Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. In *Journal of Biological Chemistry* 266 (2), pp. 1109–1116.
- Malli, R.; Naghdi, S.; Romanin, C.; Graier, W. F.** (2008): Cytosolic Ca^{2+} prevents the subplasmalemmal clustering of STIM1: an intrinsic mechanism to avoid Ca^{2+} overload. In *Journal of Cell Science* 121 (Pt 19), pp. 3133–3139.
- Manji, S. S.; Parker, N. J.; Williams, R. T.; van Stekelenburg, L.; Pearson, R. B.; Dziadek, M.; Smith, P. J.** (2000): STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. In *Biochimica et Biophysica Acta* 1481 (1), pp. 147–155.
- Manoury, B.; Tamuleviciute, A.; Tammaro, P.** (2010): TMEM16A/anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells. In *J Physiol* 588 (Pt 13), pp. 2305–2314.
- Mao, C. G.; Kim, S. H.; Almenoff, J. S.; Rudner, X. L.; Kearney, D. M.; La Kindman** (1996): Molecular cloning and characterization of SCA_{MPER}, a sphingolipid Ca^{2+} release-mediating protein from endoplasmic reticulum. In *P NATL ACAD SCI USA* 93 (5), pp. 1993–1996.
- Maruyama, T.; Kanaji, T.; Nakade, S.; Kanno, T.; Mikoshiba, K.** (1997): 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced Ca^{2+} release. In *Journal of Biochemistry* 122 (3), pp. 498–505.
- Maruyama, Y.; Ogura, T.; Mio, K.; Kato, K.; Kaneko, T.; Kiyonaka, S.; Mori, Y.; Sato, C.** (2009): Tetrameric Orai1 is a teardrop-shaped molecule with a long, tapered cytoplasmic domain. In *J Biol Chem* 284 (20), pp. 13676–13685.

13. Literaturverzeichnis

- Matranga, C.; Tomari, Y.; Shin, C.; Bartel, D. P.; Zamore, P. D.** (2005): Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. In *Cell* 123 (4), pp. 607–620.
- Matsumoto, M.; Fujii, Y.; Baba, A.; Hikida, M.; Kurosaki, T.; Baba, Y.** (2011): The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. In *Immunity* 34 (5), pp. 703–714.
- Maxfield, F. R.; Wüstner, D.** (2002): Intracellular cholesterol transport. In *J Clin Invest.* 110 (7), pp. 891–898.
- McFadzean, I.; Gibson, A.** (2002): The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. In *British Journal of Pharmacology* 135 (1), pp. 1–13.
- McNally, B. A.; Prakriya, M.** (2012): Permeation, selectivity, and gating in store-operated CRAC channels. In *J Physiol.*
- Meera, P.; Wallner, M.; Song, M.; Toro, L.** (1997): Large conductance voltage- and calcium-dependent K^+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25), pp. 14066–14071.
- Meister, G.; Tuschl, T.** (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. In *Nature* 431 (7006), pp. 343–349.
- Mercer, J. C.; DeHaven, W. I.; Smyth, J. T.; Wedel, B.; Boyles, R. R.; Bird, G. S.; Putney, J. W.** (2006): Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. In *Journal of Biological Chemistry* 281 (34), pp. 24979–24990.
- Mészáros, L. G.; Bak, J.; Chu, A.** (1993): Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca^{2+} channel. In *Nature* 364 (6432), pp. 76–79.
- Michalak, M.; Groenendyk, J.; Szabo, E.; Gold, L. I.; Opas, M.** (2009): Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. In *Biochemical Journal* 417 (3), pp. 651–666.
- Mignen, O.; Shuttleworth, T. J.** (2000): IARC, a Novel Arachidonate-regulated, Noncapacitative Ca^{2+} Entry Channel. In *Journal of Biological Chemistry* 275 (13), pp. 9114–9119.

13. Literaturverzeichnis

- Mignen, O.; Shuttleworth, T.J.** (2001): Permeation of Monovalent Cations through the Non-capacitative Arachidonate-regulated Ca^{2+} Channels in HEK293 Cells. Comparison with endogenous store-operated channels. In *Journal of Biological Chemistry* 276 (24), pp. 21365–21374.
- Mignen, O.; Thompson, J. L.; Shuttleworth, T. J.** (2001): Reciprocal regulation of capacitative and arachidonate-regulated noncapacitative Ca^{2+} entry pathways. In *J Biol Chem* 276 (38), pp. 35676–35683.
- Mignen, O.; Thompson, J. L.; Shuttleworth, T. J.** (2009): The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. In *Journal of Physiology* 587 (Pt 17), pp. 4181–4197.
- Mignen, O.; Thompson, J.L; Yule, D.I; Shuttleworth, T.J.** (2005): Agonist activation of arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective (ARC) channels in murine parotid and pancreatic acinar cells. In *The Journal of Physiology* 564 (3), pp. 791–801.
- Mignen, O.; Thompson, J. L.; Shuttleworth, T. J.** (2008): Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. In *J Physiol* 586 (2), pp. 419–425.
- Mignotte, B.; Vayssiere, J. L.** (1998): Mitochondria and apoptosis. In *Eur J Biochem* 252 (1), pp. 1–15.
- Mihara, K.** (2006): Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Morphogenesis. In *med.J. of Fukuoka* 97 (1), pp. 8–14.
- Mikoshiba, K.** (2007): IP_3 receptor/ Ca^{2+} channel: from discovery to new signaling concepts. In *J Neurochem* 102 (5), pp. 1426–1446.
- Missiaen, L.; van Acker, K.; van Baelen, K.; Raeymaekers, L.; Wuytack, F.; Parys, J. B.; Smedt, H. de; Vanoevelen, J.; Dode, L.; Rizzuto, R.; Callewaert, G.** (2004): Calcium release from the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments. In *Cell Calcium* 36 (6), pp. 479–487.
- Misumi, Y.; Misumi, Y.; Miki, K.; Takatsuki, A.; Tamura, G.; Ikehara, Y.** (1986): Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. In *J Biol Chem.* 261 (24), pp. 1398–1403.
- Miyoshi, K.; Tsukumo H.; Nagami T.; Siomi H.; Siomi M.C.** (2005): Slicer function of Drosophila Argonautes and its involvement in RISC formation. In *Genes & Development* 19 (23), pp. 2837–2848.
- Moghim, S. M.; Hunter, A. C.** (2000): Poloxamers and poloxamines in nanoparticle

13. Literaturverzeichnis

- engineering and experimental medicine. In *Trends Biotechnol* 18 (10), pp. 412–420.
- Mooren, O. L.; Galletta, B. J.; Cooper, J. A.** (2012): Roles for actin assembly in endocytosis. In *Annu. Rev. Biochem.* 81, pp. 661–686.
- Mooseker, M. S.** (1975): Organization of an actin filament-membrane complex. Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. In *The Journal of Cell Biology* 67 (3), pp. 725–743.
- Morales, S.; Camello, P. J.; Rosado, J. A.; Mawe, G. M.; Pozo, M. J.** (2005): Disruption of the filamentous actin cytoskeleton is necessary for the activation of capacitative calcium entry in naive smooth muscle cells. In *Cellular Signalling* 17 (5), pp. 635–645.
- Morone, N.; Fujiwara, T.; Murase, K. Kasai R.S; Ike, H.; Yuasa, S.; Usukura, J.; Kusumi, A.** (2006): Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. In *The Journal of Cell Biology* 174 (6), pp. 851–862.
- Motiani, R. K.; Abdullaev, I. F.; Trebak, M.** (2010): A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. In *Journal of Biological Chemistry* 285 (25), pp. 19173–19183.
- Muik, M.; Schindl, R.; Fahrner, M.; Romanin, C.** (2012): Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) current, structure, and function. In *Cell. Mol. Life Sci.*
- Mulryan, K.; Gitterman, D. P.; Lewis, C. J.; Vial, C.; Leckie, B. J.; Cobb, A. L.; Brown, J. E.; Conley, E. C.; Buell, G.; Pritchard, C. A.; Evans, R. J.** (2000): Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. In *Nature* 403 (6765), pp. 86–89.
- Nakano, A.; Luini, A.** (2010): Passage through the Golgi. In *Curr Opin Cell Biol* 22 (4), pp. 471–478.
- Ng, L. C.; Ramduny, D.; Airey, J. A.; Singer, C. A.; Keller, P. S.; Shen, X. M.; Tian, H.; Valencik, M.; Hume, J. R.** (2010): Orai1 interacts with STIM1 and mediates capacitative Ca^{2+} entry in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 299 (5), pp. C1079-1090.
- Nielsen, S. P.; Petersen, O. H.** (1972): Transport of calcium in the perfused submandibular gland of the cat. In *J Physiol* 223 (3), pp. 685–697.
- Nogales, E.** (2000): Structural insights into microtubule function. In *Annu. Rev. Biochem.* 69,

13. Literaturverzeichnis

pp. 277–302.

Noll, S.; Höfler, H.; Schaub-Kuhnen, S. (2000): Praxis der Immunhistochemie. 1st ed.

München [u.a.]: Urban & Fischer.

Novak, P.; Soukup, T. (2011): Calsequestrin distribution, structure and function, its role in normal and pathological situations and the effect of thyroid hormones. In *Physiol Res* 60 (3), pp. 439–452.

Oda, S.; Lee, K. J.; Arii, T.; Imoto, K.; Hyun, B. H.; Park, S.; Kim, H.; Im Rhyu, J.

(2010): Differential regulation of Purkinje cell dendritic spines in rolling mouse Nagoya (tg/tg), P/Q type calcium channel ($\alpha 1(A)/Ca(v)2.1$) mutant. In *Anat Cell Biol* 43 (3), pp. 211–217.

Oh-hora, M.; Yamashita, M.; Hogan, P. G.; Sharma, S.; Lamperti, E.; Chung, W.;

Prakriya, M.; Feske, S.; Rao, A. (2008): Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. In *Nature Immunology* 9 (4), pp. 432–443.

Ong, H. L.; Liu, X.; Sharma, A.; Hegde, R. S.; Ambudkar, I. S. (2007): Intracellular Ca^{2+} release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. In *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 453 (6), pp. 797–808.

Ousingsawat, J.; Kongsuphol, P.; Schreiber, R.; Kunzelmann, K. (2011): CFTR and TMEM16A are separate but functionally related Cl⁻ channels. In *Cell Physiol Biochem* 28 (4), pp. 715–724.

Palmieri, F. (2004): The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. In *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447 (5), pp. 689–709.

Palty, R.; Sekler, I. (2012): The mitochondrial Na^{+}/Ca^{2+} exchanger. In *Cell Calcium*.

Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, M. K.; Millard, P.

J.; Mao, F.; Leung, W. Y. (1999): Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. In *J Histochem Cytochem* 47 (9), pp. 1179–1188.

Pantaloni, D.; Le Clainche, C.; Carlier, M. F. (2001): Mechanism of actin-based motility. In *Science* 292 (5521), pp. 1502–1506.

Parekh, A. B. (2007): Functional consequences of activating store-operated CRAC channels. In *Cell Calcium* 42 (2), pp. 111–121.

Parekh, A. B. (2008): Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels. In *Cell*

13. Literaturverzeichnis

- Calcium* 44 (1), pp. 6–13.
- Parekh, A. B.; Penner, R.** (1997): Store depletion and calcium influx. In *Physiol Rev* 77 (4), pp. 901–930.
- Parekh, A. B.; Putney, J. W.** (2005): Store-operated calcium channels. In *Physiol Rev* 85 (2), pp. 757–810.
- Park, C. Y.; Hoover, P. J.; Mullins, F. M.; Bachhawat, P.; Covington, E. D.; Raunser, S.; Walz, T.; Garcia, K. C.; Dolmetsch, R. E.; Lewis, R. S.** (2009): STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. In *Cell* 136 (5), pp. 876–890.
- Parker, N. J.; Begley, C. G.; Smith, P. J.; Fox, R. M.** (1996): Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5. In *Genomics* 37 (2), pp. 253–256.
- Parsons, D. S.; Paterson, C. R.** (1965): Fluid and solute transport across fat colonic mucosa. In *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.* 50 (2), pp. 220–231.
- Parvez, S.; Beck, A.; Peinelt, C.; Soboloff, J.; Lis, A.; Monteilh-Zoller, M.; Gill, D. L.; Fleig, A.; Penner, R.** (2008): STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. In *FASEB Journal* 22 (3), pp. 752–761.
- Patel, S.; Ramakrishnan, L.; Rahman, T.; Hamdoun, A.; Marchant, J. S.; Taylor, C. W.; Brailoiu, E.** (2011): The endo-lysosomal system as an NAADP-sensitive acidic Ca^{2+} store: role for the two-pore channels. In *Cell Calcium* 50 (2), pp. 157–167.
- Petersen, O. H.; Tepikin, A. V.** (2008): Polarized Calcium Signaling in Exocrine Gland Cells. In *Annu. Rev. Physiol.* 70 (1), pp. 273–299.
- Patterson, R. L.; Boehning, D.; Snyder, S. H.** (2004): Inositol 1,4,5-trisphosphatereceptors as signal integrators. In *Annu. Rev. Biochem.* 73, pp. 437–465.
- Patterson, R. L.; van Rossum, D. B.; Gill, D. L.** (1999): Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. In *Cell* 98 (4), pp. 487–499.
- Pedersen, S. F.; Owsianik, G.; Nilius, B.** (2005): TRP channels: an overview. In *Cell Calcium* 38 (3-4), pp. 233–252.
- Peng, M.; Jarett, L.; Meade, R.; Madaio, M. P.; Hancock, W. W.; George, A. L.; Neilson, E. G.; Gasser, D. L.** (2004): Mutant prenyltransferase-like mitochondrial protein (PLMP) and mitochondrial abnormalities in kd/kd mice. In *Kidney Int* 66 (1), pp. 20–28.

13. Literaturverzeichnis

- Penna, A.; Demuro, A.; Yeromin, A. V.; Zhang, S. L.; Safrina, O.; Parker, I.; Cahalan, M. D.** (2008): The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. In *Nature* 456 (7218), pp. 116–120.
- Petersen, O. H.; Maruyama, Y.** (1984): Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. In *Nature* 307 (5953), pp. 693–696.
- Petersen, O. H.; Petersen, C. C. H.; Kasai, H.** (1994): Calcium and Hormone Action. In *Annu. Rev. Physiol.* 56 (1), pp. 297–319.
- Pham, J. W.; Pellino, J. L.; Lee, Y. S.; Carthew, R. W.; Sontheimer, E. J.** (2004): A Dicer-2-dependent 80S complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. In *Cell* 117 (1), pp. 83–94.
- Pinton, P.; Pozzan, T.; Rizzuto, R.** (1998): The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. In *EMBO J* 17 (18), pp. 5298–5308.
- Pizzo, P.; Pozzan, T.** (2007): Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. In *Trends cell biol.* 17 (10), pp. 511–517.
- Plenge-Tellechea, F.; Soler, F.; Fernandez-Belda, F.** (1997): On the inhibition mechanism of sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases by cyclopiazonic acid. In *J Biol Chem* 272 (5), pp. 2794–2800.
- Poburko, D.; Potter, K.; van Breemen, E.; Fameli, N.; Liao, C. H.; Basset, O.; Ruegg, U. T.; van Breemen, C.** (2006): Mitochondria buffer NCX-mediated Ca^{2+} -entry and limit its diffusion into vascular smooth muscle cells. In *Cell Calcium* 40 (4), pp. 359–371.
- Poggioli, J.; Putney, J. W.** (1982): Net calcium fluxes in rat parotid acinar cells. In *Pflügers Arch.* 392 (3), pp. 239–243.
- Pollard, T. D.** (1976): Cytoskeletal functions of cytoplasmic contractile proteins. In *J Supramol Struct* 5 (3), pp. 317–334.
- Portela-Gomes, G. M.; Grimelius, L.; Bergstrom, R.** (1984): Enterochromaffin (Argentaffin) cells of the rat gastrointestinal tract. An ultrastructural study. In *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 92 (2), pp. 83–89.
- Pozzan, T.; Rizzuto, R.; Volpe, P.; Meldolesi, J.** (1994): Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. In *Physiological Reviews* 74 (3), pp. 595–636.
- Prakriya, M.** (2009): The molecular physiology of CRAC channels. In *Immunol. Rev.* 231 (1), pp. 88–98.

13. Literaturverzeichnis

- Prakriya, M.; Feske, S.; Gwack, Y.; Srikanth, S.; Rao, A.; Hogan, P. G.** (2006): Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. In *Nature* 443 (7108), pp. 230–233.
- Putney, J. W.** (1977): Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland. In *Journal of Physiology* 268 (1), pp. 139–149.
- Putney, J. W.** (1986): A model for receptor-regulated calcium entry. In *Cell Calcium* 7 (1), pp. 1–12.
- Putney, J. W.; Poggioli, J.; Weiss, S. J.** (1981): Receptor Regulation of Calcium Release and Calcium Permeability in Parotid Glands Cells [and Discussion]. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 296 (1080), pp. 37–45.
- Qi, Y.; Am D.; Hannon, G. J.** (2005): Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. In *Mol. Cell* 19 (3), pp. 421–428.
- Raffaelli, G.; Saviane, C.; Mohajerani, M. H.; Pedarzani, P.; Cherubini, E.** (2004): BK potassium channels control transmitter release at CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. In *J Physiol* 557 (Pt 1), pp. 147–157.
- Ramos-Vara, J. A.** (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. In *Veterinary Pathology* 42 (4), pp. 405–426.
- Ramsey, I. S.; Delling, M.; Clapham, D. E.** (2006): An introduction to TRP channels. In *Annu Rev Physiol* 68, pp. 619–647.
- Rand, T. A.; Petersen, S.; Du, F.; Wang, X.** (2005): Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. In *Cell* 123 (4), pp. 621–629.
- Randriamampita, C.; Tsien, R.Y.** (1993): Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. In *Nature* 364 (6440), pp. 809–814.
- Rao, J. N.; Rathor, N.; Zou, T.; Liu, L.; Xiao, L.; Yu, T. X.; Cui, Y. H.; Wang, J. Y.** (2010): STIM1 translocation to the plasma membrane enhances intestinal epithelial restitution by inducing TRPC1-mediated Ca^{2+} signaling after wounding. In *Am J Physiol Cell Physiol* 299 (3), pp. C579–588.
- Rasmussen, H.; Barrett, P.; Smallwood, J.; Bollag, W.; Isales, C.** (1990): Calcium ion as intracellular messenger and cellular toxin. In *Environ Health Perspect* 84, pp. 17–25.
- Rassouli, F. B.; Matin, M. M.** (2009): Gene silencing in human embryonic stem cells by RNA interference. In *Biochem Biophys Res Commun* 390 (4), pp. 1106–1110.
- Ravelli, R. B.G; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M.** (2004): Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a

13. Literaturverzeichnis

- stathmin-like domain. In *Nature* 428 (6979), pp. 198–202.
- Ribeiro, C. M.; Reece, J.; Putney, J. W.** (1997): Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced i signaling, but not for capacitative calcium entry. In *J Biol Chem* 272 (42), pp. 26555–26561.
- Ribeiro, R.; Heinke, B.; Diener, M.** (2001): Cell volume-induced changes in K^+ transport across the rat colon. In *Acta Physiol Scand* 171 (4), pp. 445–458.
- Rijke, R. P.; Plaisier, H. M.; Langendoen, N. J.** (1979): Epithelial cell kinetics in the descending colon of the rat. In *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 30 (1), pp. 85–94.
- Ringer, S.** (1883): A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. In *Journal of Physiology* 4 (1), pp. 29–42.
- Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z.; Zielenski, J.; Lok, S.; Plavsic, N.; Chou, J. L.** (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. In *Science* 245 (4922), pp. 1066–1073.
- Ritchie, M. F.; Samakai, E.; Soboloff, J.** (2012): STIM1 is required for attenuation of PMCA-mediated Ca^{2+} clearance during T-cell activation. In *EMBO J* 31 (5), pp. 1123–1133.
- Rock, J. R.; Harfe, B. D.** (2008): Expression of TMEM16 paralogs during murine embryogenesis. In *Developmental Dynamics* 237 (9), pp. 2566–2574.
- Rogers, T. B.; Inesi, G.; Wade, R.; Lederer, W. J.** (1995): Use of thapsigargin to study Ca^{2+} homeostasis in cardiac cells. In *Biosci Rep.* 15 (5), pp. 341–349.
- Roos, J.; DiGregorio, P. J.; Yeromin, A. V.; Ohlsen, K.; Lioudyno, M.; Zhang, S.; Safrina, O.; Kozak, J. A.; Wagner, S. L.; Cahalan, M. D.; Velicelebi, G.; Stauderman, K. A.** (2005): STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. In *Journal of Cell Biology* 169 (3), pp. 435–445.
- Rosado, J. A.; Redondo, P. C.; Sage, S. O.; Pariente, J. A.; Salido, G. M.** (2005): Store-operated Ca^{2+} entry: vesicle fusion or reversible trafficking and de novo conformational coupling? In *J. Cell. Physiol.* 205 (2), pp. 262–269.
- Rosado, J. A.; Sage, S. O.** (2000a): Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca^{2+} stores are depleted. In *Biochem. J.* 350, pp. 631–635.
- Rosado, J. A.; Sage, S. O.** (2000b): Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry

13. Literaturverzeichnis

- in human platelets. In *J. Physiol. London* 529 (1), pp. 159–169.
- Rosado, J. A.; Sage, S. O.** (2001): Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTrp1) channels in human platelets. In *Biochemical Journal* 356 (Pt 1), pp. 191–198.
- Rosado, J.A; Jenner, S.; Sage, S.O.** (2000): A Role for the Actin Cytoskeleton in the Initiation and Maintenance of Store-mediated Calcium Entry in Human Platelets. Evidence for conformational coupling. In *Journal of Biological Chemistry* 275 (11), pp. 7527–7533.
- Rossier, M. F.** (2006): T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria. In *Cell Calcium* 40 (2), pp. 155–164.
- Rothberg, B. S.** (2012): The BK channel: a vital link between cellular calcium and electrical signaling. In *Protein Cell*.
- Rousset, M.** (1986): The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. In *Biochimie* 68 (9), pp. 1035–1040.
- Roy, J.; Lefkimmatis, K.; Moyer, M. P.; Curci, S.; Hofer, A. M.** (2010): The -3 fatty acid eicosapentaenoic acid elicits cAMP generation in colonic epithelial cells via a "store-operated" mechanism. In *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 299 (3), pp. G715.
- Sah, P.; Faber, L. E. S.** (2002): Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. In *Progress in Neurobiology* 66 (5), pp. 345–353.
- Satoh, K.; Matsu-ura, T.; Enomoto, M.; Nakamura, H.; Michikawa, T.; Mikoshiba, K.** (2011): Highly Cooperative Dependence of Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) 2a Pump Activity on Cytosolic Calcium in Living Cells. In *Journal of Biological Chemistry* 286 (23), pp. 20591–20599.
- Scharenberg, A. M.; Humphries, L. A.; Rawlings, D. J.** (2007): Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. In *Nat Rev Immunol* 7 (10), pp. 778–789.
- Schoenenberger, C. A.; Mannherz, H. G.; Jockusch, B. M.** (2011): Actin: from structural plasticity to functional diversity. In *Eur J Cell Biol* 90 (10), pp. 797–804.
- Schofield, G. C.; Atkins, A. M.** (1970): Secretory immunoglobulin in columnar epithelial cells of the large intestine. In *J Anat* 107 (Pt 3), pp. 491–504.
- Schroeder, B. C.; Cheng, T.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y.** (2008): Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. In *Cell* 134 (6), pp. 1019–1029.
- Schroer, T. A.; Sheetz, M. P.** (1991): Functions of microtubule-based motors. In *Annual*

13. Literaturverzeichnis

Review of Physiology 53, pp. 629–652.

- Schultheiss, G.; Ribeiro, R.; Schafer, K. H.; Diener, M.** (2003): Activation of apical K^+ conductances by muscarinic receptor stimulation in rat distal colon: Fast and slow components. In *J Membrane Biol* 195 (3), pp. 183–196.
- Schultheiss, G.; Seip, G.; Kocks, S. L.; Diener, M.** (2002): Ca^{2+} -dependent and -independent Cl^- secretion stimulated by the nitric oxide donor, GEA 3162, in rat colonic epithelium. In *European Journal of Pharmacology* 444 (1-2), pp. 21–30.
- Schultheiss, G.; Siefjediers, A.; Diener, M.** (2005): Muscarinic receptor stimulation activates a Ca^{2+} -dependent Cl^- conductance in rat distal colon. In *J Membrane Biol* 204 (3), pp. 117–127.
- Schwerzmann, K.; Pedersen, P. L.** (1986): Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. In *Arch. Biochem. Biophys.* 250 (1), pp. 1–18.
- Scott, I.; Youle, R. J.** (2010): Mitochondrial fission and fusion. In *Essays Biochem* 47, pp. 85–98.
- Seip, G.; Schultheiss, G.; Kocks, S. L.; Diener, M.** (2001): Interaction between store-operated non-selective cation channels and the Na^+ - Ca^{2+} exchanger during secretion in the rat colon. In *Experimental Physiology* 86 (4), pp. 461–468.
- Shibata, Y.; Voeltz, G. K.; Rapoport, T. A.** (2006): Rough sheets and smooth tubules. In *Cell* 126 (3), pp. 435–439.
- Shuttleworth, T. J.** (2009): Arachidonic acid, ARC channels, and Orai proteins. In *Cell Calcium* 45 (6), pp. 602–610.
- Shuttleworth, T. J.; Thompson, J. L.; Mignen, O.** (2007): STIM1 and the noncapacitative ARC channels. In *Cell Calcium* 42 (2), pp. 183–191.
- Shuttleworth, T. J.** (2012): STIM and Orai proteins and the non-capacitative ARC channels. In *Front Biosci* 17, pp. 847–860.
- Siefjediers, A.; Hardt, M.; Prinz, G.; Diener, M.** (2007): Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor subtypes at rat colonic epithelium. In *Cell Calcium* 41 (4), pp. 303–315.
- Sigg, D.; Bezanilla, F.** (1997): Total Charge Movement per Channel. The Relation between Gating Charge Displacement and the Voltage Sensitivity of Activation. In *The Journal of General Physiology* 109 (1), pp. 27–39.
- Smaili, S. S.; Hsu, Y. T.; Youle, R. J.; Russell, J. T.** (2000): Mitochondria in Ca^{2+} signaling

13. Literaturverzeichnis

- and apoptosis. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 32 (1), pp. 35–46.
- Smith, J. G.; Walzem, R. L.; German, J. B.** (1993): Liposomes as agents of DNA transfer. In *Biochimica et Biophysica Acta* 1154 (3-4), pp. 327–340.
- Smyth, J. T.; Am Beg, Wu, S.; Putney JW, JR; Rusan, N. M.** (2012): Phosphoregulation of STIM1 Leads to Exclusion of the Endoplasmic Reticulum from the Mitotic Spindle. In *Curr Biol.*
- Smyth, J. T.; DeHaven, W. I.; Bird, G. S.; Putney, J. W.** (2007): Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca^{2+} channel activator STIM1. In *Journal of Cell Science* 120 (21), pp. 3762–3771.
- Smyth, J. T.; Hwang, S. Y.; Tomita, T.; DeHaven, W. I.; Mercer, J. C.; Putney, J. W.** (2010): Activation and regulation of store-operated calcium entry. In *J. Cell Mol. Med.* 14 (10), pp. 2337–2349.
- Smythe, E.; Ayscough, K. R.** (2006): Actin regulation in endocytosis. In *J. Cell. Sci.* 119 (Pt 22), pp. 4589–4598.
- Soboloff, J.; Spassova, M. A.; Dziadek, M. A.; Gill, D. L.** (2006): Calcium signals mediated by STIM and Orai proteins--a new paradigm in inter-organelle communication. In *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 (11), pp. 1161–1168.
- Sobotta, J.; Staubesand, J.; Putz, R.** (2006): Atlas der Anatomie des Menschen. 22nd ed. München [u.a.]: Urban & Schwarzenberg.
- Soll, A. H.** (1981): Extracellular calcium and cholinergic stimulation of isolated canine parietal cells. In *J. Clin. Invest.* 68 (1), pp. 270–278.
- Song, M. Y.; Makino, A.; Yuan, J. X. J.** (2011): STIM2 Contributes to Enhanced Store-operated Ca Entry in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. In *Pulm Circ* 1 (1), pp. 84–94.
- Sontheimer, E. J.** (2005): Assembly and function of RNA silencing complexes. In *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2), pp. 127–138.
- Sorensen, M. V.; Matos, J. E.; Praetorius, H. A.; Leipziger, J.** (2010): Colonic potassium handling. In *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 459 (5), pp. 645–656.
- Specht, W.** (1977): Morphology of intestinal wall. Amsterdam: Excerpta medica.
- Spizizen, J.; Reilly, B. E.; Evans, A. H.** (1966): Microbial Transformation and Transfection. In *Annu. Rev. Microbiol.* 20 (1), pp. 371–400.
- Stathopulos, P. B.; Ikura, M.** (2009): Structurally delineating stromal interaction molecules

13. Literaturverzeichnis

- as the endoplasmic reticulum calcium sensors and regulators of calcium release-activated calcium entry. In *Immunol. Rev.* 231 (1), pp. 113–131.
- Stathopulos, P. B.; Li, G. Y.; Plevin, M. J.; Ames, J. B.; Ikura, M.** (2006): Stored Ca^{2+} depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca^{2+} entry. In *Journal of Biological Chemistry* 281 (47), pp. 35855–35862.
- Stathopulos, P. B.; Zheng, L.; Li, G. Y.; Plevin, M. J.; Ikura, M.** (2008): Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. In *Cell* 135 (1), pp. 110–122.
- Steidle, J.; Diener, M.** (2011): Effects of carbon monoxide on ion transport across rat distal colon. In *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300 (2), pp. G207–216.
- Stokes, D. L.; Wagenknecht, T.** (2000): Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: structure and function of Ca^{2+} -ATPase and the ryanodine receptor. In *Eur J Biochem* 267 (17), pp. 5274–5279.
- Stossel, T. P.** (1984): Contribution of actin to the structure of the cytoplasmic matrix. In *Journal of Cell Biology* 99 (1 Pt 2), pp. 15s–21s.
- Strabel, D.; Diener, M.** (1995): Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. In *Eur. J. Pharmacol.* 274 (1-3), pp. 181–191.
- Streb, H.; Irvine, R. F.; Berridge, M. J.; Schulz, I.** (1983): Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. In *Nature* 306 (5938), pp. 67–69.
- Sugiyama, T.; Yamamoto-Hino, M.; Miyawaki, A.; Furuichi, T.; Mikoshiba, K.; Hasegawa, M.** (1994): Subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in human hematopoietic cell lines: dynamic aspects of their cell-type specific expression. In *FEBS LETT* 349 (2), pp. 191–196.
- Sunagawa, M.; Ohta, T.; Nozoe, S.** (1983): Biosynthesis of brefeldin A. Introduction of oxygen at the C-7 position. In *J Antibiot (Tokyo)* 36 (1), pp. 25–29.
- Suzuki, H.** (1985): Electrical responses of smooth muscle cells of the rabbit ear artery to adenosine triphosphate. In *J Physiol* 359, pp. 401–415.
- Szabadkai, G.; Simoni, A. M.; Bianchi, K.; Stefani, D. de; Leo, S.; Wieckowski, M. R.; Rizzuto, R.** (2006): Mitochondrial dynamics and Ca^{2+} signaling. In *Biochim Biophys Acta* 1763 (5-6), pp. 442–449.

13. Literaturverzeichnis

- Takahashi, Y.; Murakami, M.; Watanabe, H.; Hasegawa, H.; Ohba, T.; Munehisa, Y. et al.** (2007): Essential role of the N-terminus of murine Orai1 in store-operated Ca^{2+} entry. In *Biochemical & Biophysical Research Communications* 356 (1), pp. 45–52.
- Takeichi, M.** (1988): The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. In *Development* 102 (4), pp. 639–655.
- Tamada, T.; Hug, M. J.; Frizzell, R. A.; Bridges, R. J.** (2001): Microelectrode and impedance analysis of anion secretion in Calu-3 cells. In *JOP* 2 (4 Suppl), pp. 219–228.
- Tamura, G.; Ando, K.; Suzuki, S.; Takatsuki, A.; Arima, K.** (1968): Antiviral activity of brefeldin A and verrucarin A. In *Journal of Antibiotics* 21 (2), pp. 160–161.
- Tanious, F.A.; Veal, J.M.; Buczak, H.; Ratmeyer, L.S.; Wilson, W.D.** (1992): DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. In *Biochemistry*. 31 (12), pp. 3103–3112.
- Taylor, C. F.; Paton, N. W.; Garwood, K. L.; Kirby, P. D.; Stead, D. A.; Yin, Z.; Deutsch, E. W.; Selway, L.; Walker, J.; Riba-Garcia, I.; Mohammed, S.; Deery, M. J.; Howard, J. A.; Dunkley, T.; Aebersold, R.; Kell, D. B.; Lilley, K. S.; Roepstorff, P.; Yates, J. R.; Brass, A.; Brown, A. J.P.; Cash, P.; Gaskell, S. J.; Hubbard, S. J.; Oliver, S. G.** (2003): A systematic approach to modeling, capturing, and disseminating proteomics experimental data. In *Nat Biotechnol* 21 (3), pp. 247–254.
- Taylor, C. W.; da Fonseca, P. C. A.; Morris, E. P.** (2004): IP_3 receptors: the search for structure. In *Trends. Biochem. Sci.* 29 (4), pp. 210–219.
- Taylor, C. W.; Laude, A. J.** (2002): IP_3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca^{2+} . In *Cell Calcium* 32 (5-6), pp. 321–334.
- Taylor, C. W.** (2006): Store-operated Ca^{2+} entry: A STIMulating stOrai. In *Trends in Biochemical Sciences* 31 (11), pp. 597–601.
- Terasaki, M.; Chen, L. B.; Fujiwara, K.** (1986): Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. In *Journal of Cell Biology* 103 (4), pp. 1557–1568.
- Thomas, D.; Hanley, M.R.** (1995): Evaluation of calcium influx factors from stimulated Jurkat T-lymphocytes by microinjection into *Xenopus* oocytes. In *Journal of Biological Chemistry* 270 (12), pp. 6429–6432.
- Tomari, Y. Zamore P. D.** (2005): Perspective: machines for RNAi. In *Genes Dev* 19 (5), pp. 517–529.

13. Literaturverzeichnis

- Tomari, Y.; Du, T. T.; Haley, B.; Schwarz, D. S.; Bennett, R.; Cook, H. A.; Koppetsch, B. S.; Theurkauf, W. E.; Zamore, P. D.** (2004): RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. In *Cell* 116 (6), pp. 831–841.
- Trebak, M.; Vazquez, G.; St. Bird, G. J.; Putney, J. W.** (2003): The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. In *Cell Calcium* 33 (5-6), pp. 451–461.
- Tsien R.Y.; Pozzan, T.; Rink, T.J.** (1982): Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. In *The Journal of Cell Biology* 94 (2), pp. 325–334.
- Tsien, R. W.; Tsien, R.Y.** (1990): Calcium channels, stores, and oscillations. In *Annu Rev Cell Biol* 6, pp. 715–760.
- Tsien, R.Y.** (1980): New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. In *Biochemistry* 19 (11), pp. 2396–2404.
- Tsien, R.Y.; Poenie M.** (1986): Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling. In *Trends Biochem Sci* 11 (11), pp. 450–455.
- Tsubouchi, S.; Leblond, C. P.** (1979): Migration and turnover of entero-endocrine and caveolated cells in the epithelium of the descending colon, as shown by radioautography after continuous infusion of 3H-thymidine into mice. In *American Journal of Anatomy* 156 (4), pp. 431–451.
- Tufty, R. M.; Kretsinger, R. H.** (1975): Troponin and parvalbumin calcium binding regions predicted in myosin light chain and T4 lysozyme. In *Science* 187 (4172), pp. 167–169.
- Turnberg, L. A.** (1970): Electrolyte absorption from the colon. In *Gut* 11 (12), pp. 1049–1054.
- Ussing, H. H.; Zerahn, K.** (1951): Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. In *Acta Physiol Scand* 23 (2-3), pp. 110–127.
- van Baelen, K.; Dode, L.; Vanoevelen, J.; Callewaert, G.; Smedt, H. de; Missiaen, L.; Parys, J. B.; Raeymaekers, L.; Wuytack, F.** (2004): The $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ pumps in the Golgi apparatus. In *Biochim Biophys Acta* 1742 (1-3), pp. 103–112.
- Vanoevelen, J.; Raeymaekers, L.; Parys, J. B.; Smedt, H. de; van Baelen, K.; Callewaert, G.; Wuytack, F.; Missiaen, L.** (2004): Inositol trisphosphate producing agonists do not mobilize the thapsigargin-insensitive part of the endoplasmic-reticulum and Golgi Ca^{2+} store. In *Cell Calcium* 35 (2), pp. 115–121.

13. Literaturverzeichnis

- Vergara, C.; Latorre, R.; Marrion, N. V.; Adelman, J. P.** (1998): Calcium-activated potassium channels. In *Curr Opin Neurobiol* 8 (3), pp. 321–329.
- Vig, M.; Beck, A.; Billingsley, J. M.; Lis, A.; Parvez, S.; Peinelt, C.; Koomoa, D. L.; Soboloff, J.; Gill, D. L.; Fleig, A.; Kinet, J. P.; Penner, R.** (2006): CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. In *Current Biology* 16 (20), pp. 2073–2079.
- Vinogradova, T. M.; Maltsev, V. A.; Bogdanov, K. Y.; Lyashkov, A. E.; Lakatta, E. G.** (2005): Rhythmic Ca^{2+} oscillations drive sinoatrial nodal cell pacemaker function to make the heart tick. In *Ann. NY. Acad. Sci.* 1047, pp. 138–156.
- Vriens, J.; Watanabe, H.; Janssens, A.; Droogmans, G.; Voets, T.; Nilius, B.** (2004): Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. In *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (1), pp. 396–401.
- Wade, R. H.** (2009): On and around microtubules: an overview. In *Mol Biotechnol* 43 (2), pp. 177–191.
- Walsh, C. M.; Chvanov, M.; Haynes, L. P.; Petersen, O. H.; Tepikin, A. V.; Burgoyne, R. D.** (2010): Role of phosphoinositides in STIM1 dynamics and store-operated calcium entry. In *Biochem J* 425 (1), pp. 159–168.
- Wang, Y.; Deng, X.; Zhou, Y.; Hendron, E.; Mancarella, S.; Ritchie, M. F.; Tang, X. D.; Baba, Y.; Kurosaki, T.; Mori, Y.; Soboloff, J.; Gill, D. L.** (2009): STIM protein coupling in the activation of Orai channels. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (18), pp. 7391–7396.
- Wedel, B.; Boyles, R. R.; Putney, J. W.; Bird, G. S.** (2007): Role of the store-operated calcium entry proteins Stim1 and Orai1 in muscarinic cholinergic receptor-stimulated calcium oscillations in human embryonic kidney cells. In *The Journal of Physiology* 579 (3), pp. 679–689.
- Wessendorf, M. W.; Brelje, T. C.** (1992): Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas red, and cyanine 3.18. In *Histochemistry* 98 (2), pp. 81–85.
- Wiedemann, N.; Frazier, A. E.; Pfanner, N.** (2004): The protein import machinery of mitochondria. In *J Biol Chem* 279 (15), pp. 14473–14476.
- Wieland, T.** (1987): 50 Jahre Phalloidin. *Naturwissenschaften* 74, pp. 367–373.
- Williams, R. T.; Manji, S. S.; Parker, N. J.; Hancock, M. S.; van Stekelenburg, L.; Eid, J.**

13. Literaturverzeichnis

- P.; Senior, P. V.; Kazenwadel, J. S.; Shandala, T.; Saint, R.; Smith, P. J.; Dziadek, M. A.** (2001): Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. In *Biochem J* 357 (Pt 3), pp. 673–685.
- Williams, R. T.; Senior, P. V.; van Stekelenburg, L.; Layton, J. E.; Smith, P. J.; Dziadek, M. A.** (2002): Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation. In *Biochimica et Biophysica Acta* 1596 (1), pp. 131–137.
- Woolcott, O. O.; Gustafsson, A. J.; Dzabic, M.; Pierro, C.; Tedeschi, P.; Sandgren, J.; Bari, M. R.; Nguyen, K. H.; Bianchi, M.; Rakonjac, M.; Radmark, O.; Ostenson, C. G.; Islam, M. S.** (2006): Arachidonic acid is a physiological activator of the ryanodine receptor in pancreatic beta-cells. In *Cell Calcium* 39 (6), pp. 529–537.
- Wu, M. M.; Buchanan, J.; Luik, R. M.; Lewis, R. S.** (2006): Ca^{2+} store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. In *Journal of Cell Biology* 174 (6), pp. 803–813.
- Wulf, E.; Deboen, A.; Bautz, F. A.; Faulstich, H.; Wieland, T.** (1979): Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. In *P. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (9), pp. 4498–4502.
- Wuytack, F.; Raeymaekers, L.; Missiaen, L.** (2003): PMR1/SPCA Ca^{2+} pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca^{2+} store. In *Pflügers Arch.* 446 (2), pp. 148–153.
- Xia, X. M.; Fakler, B.; Rivard, A.; Wayman, G.; Johnson-Pais, T.; Keen, J. E.; Ishii, T.; Hirschberg, B.; Bond, C. T.; Lutsenko, S.; Maylie, J.; Adelman, J. P.** (1998): Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. In *Nature* 395 (6701), pp. 503–507.
- Xing, J.; Strange, K.** (2010): Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and loss of PLCgamma activity inhibit TRPM channels required for oscillatory Ca^{2+} signaling. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 298 (2), pp. C274–282.
- Xu, L.; Tripathy, A.; Pasek, D. A.; Meissner, G.** (1998): Potential for pharmacology of ryanodine receptor/calcium release channels. In *Ann N Y Acad Sci* 853, pp. 130–148.
- Xu, L.; Tripathy, A.; Pasek, D. A.; Meissner, G.** (1999): Ruthenium Red Modifies the Cardiac and Skeletal Muscle Ca^{2+} Release Channels (Ryanodine Receptors) by Multiple Mechanisms. In *Journal of Biological Chemistry* 274 (46), pp. 32680–32691.

13. Literaturverzeichnis

- Yamamoto, T.; Yamada, A.; Shinohara, Y.** (2010): Mechanisms of Cytochrome c Release from Mitochondria as Revealed by Proteomics Analysis. In *Biophys.* 50 (3), pp. 124–125.
- Yamazaki, D.; Yamazaki, T.; Takeshima, H.** (2009): New molecular components supporting ryanodine receptor-mediated Ca^{2+} release: roles of junctophilin and TRIC channel in embryonic cardiomyocytes. In *Pharmacol Ther* 121 (3), pp. 265–272.
- Yazejian, B.; DiGregorio, D. A.; Vergara, J. L.; Poage, R. E.; Meriney, S. D.; Grinnell, A. D.** (1997): Direct measurements of presynaptic calcium and calcium-activated potassium currents regulating neurotransmitter release at cultured *Xenopus* nerve-muscle synapses. In *Journal of Neuroscience* 17 (9), pp. 2990–3001.
- Yeromin, A. V.; Zhang, S. L.; Jiang, W.; Yu, Y.; Safrina, O.; Cahalan, M. D.** (2006): Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. In *Nature* 443 (7108), pp. 226–229.
- Zha, X.; Chandra, S.; Ridsdale, A. J.; Morrison, G. H.** (1995): Golgi apparatus is involved in intracellular Ca^{2+} regulation in epithelial LLC-PK1 cells. In *Am J Physiol* 268 (5 Pt 1), pp. C1133–1140.
- Zhang, M.; Abrams, C.; Wang, L.; Gizzi, A.; He, L.; Lin, R.; Chen, Y.; Loll, P. J.; Pascal, J. M.; Zhang, J. F.** (2012): Structural basis for calmodulin as a dynamic calcium sensor. In *Structure* 20 (5), pp. 911–923.
- Zhang, S. L.; Kozak, J. A.; Jiang, W.; Yeromin, A. V.; Chen, J.; Yu, Y.; Penna, A.; Shen, W.; Chi, V.; Cahalan, M. D.** (2008): Store-dependent and -independent modes regulating Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity of human Orai1 and Orai3. In *J Biol Chem* 283 (25), pp. 17662–17671.
- Zhang, S. L.; Yu, Y.; Roos, J.; Kozak, J. A.; Deerinck, T. J.; Ellisman, M. H.; Stauderman, K. A.; Cahalan, M. D.** (2005): STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. In *Nature* 437 (7060), pp. 902–905.
- Zhang, S.; Fritz, N.; Ibarra, C.; Uhlén, P.** (2011): Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Subtype-Specific Regulation of Calcium Oscillations. In *Neurochem. Res.* 36 (7), pp. 1175–1185.
- Zimmerman, T. W.; Dobbins, J. W.; Binder, H. J.** (1983): Role of calcium in the regulation of colonic secretion in the rat. In *Am J Physiol* 244 (5), pp. G552–560.
- Zoratti, M.; Szabo, I.** (1995): The mitochondrial permeability transition. In *Biochimica et*

13. Literaturverzeichnis

Biophysica Acta 1241 (2), pp. 139–176.

14. Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen Mitarbeitern der Veterinärphysiologie bedanken.

Herrn Prof. Dr. Martin Diener danke ich für seine große Unterstützung und dafür, dass er mein Interesse für diese Doktorarbeit geweckt hat.

Vielen Dank auch an Dr. Christoph Rummel, Dr. Julia Steidle, Sandra Bader, Anna Bell, Dr. Thomas Hatzelmann, Eric Pollatzek, die mir den Einstieg in die Arbeit erleichtert haben. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts, die dazu beigetragen haben, dass die Physiologie ein derart angenehmer Arbeitsplatz für mich war. Im besonderen hat es mir viel Spaß gemacht mit Dr. Matthias Rehn, Dr. Ervice Pouokam, Brigitta Brück, Eva-Maria Haas, Bärbel Schmidt und Alice Stockinger zusammen zu arbeiten. Und unser Praktikant Elias Valduesa. Er hat mir bei Datenbearbeitung viel geholfen. Ich war begeistert, dass ich neben der Arbeit so viele gesellige Veranstaltungen miterleben durfte.

Ich bedanke mich auch an freundliche Gabe der Zelllinie HT29/B26 von Prof. Dr. M. Fromm, Charité Berlin. Gedankt sei Thierry Capiod Ph.D., INSERM für seine freundliche Unterstützung bei der Literaturbeschaffung. Ebenso Danke an Stefan Feske MD, NYU für seine Ratschläge über Literatur. Ich bedanke mich auch bei Dr. Barbara Döring, Institut für Veterinär- Pharmakologie, an die freundliche Ausleihe von Literatur.

Ansonsten möchte ich allen meinen Freunden und Bekannten, besonders Stefanie Geutebrück und Dr. Ronald Metzing, für ihre seelische und ausgleichende Unterstützung danken.

Schließlich wäre das alles nicht möglich gewesen, wenn meine Eltern, meine Tante, meine Schwester, mein Bruder und Josef, der Labrador, nicht immer für mich da gewesen wären. Sie sind zwar in Japan, aber sind sie geistig immer bei mir. Danke!

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

16. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Kaoru Onodera